

Université de Montréal

**Prévention de la Maladie du greffon contre l'hôte par thérapie
photodynamique**

par

Radia Sidi Boumédine

Programme de Sciences biomédicales

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.Sc.)

en Sciences biomédicales

Avril, 2003

© Radia Sidi Boumédine, 2003



VW

4

1158

2003

NT 101

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Prévention de la maladie du greffon contre l'hôte par thérapie
photodynamique.**

présenté par :

Radia Sidi Boumédine

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Eric Millot

Président du jury

Denis-Claude Roy

Directeur de recherche

Guy Delespesse

Membre du jury

Sommaire

La maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) et l'altération reconstitution immunitaire représentent deux obstacles majeurs au succès et à l'efficacité de la greffe de cellules souches hématopoïétiques (GCSH) allogéniques. La présente étude a pour but de déterminer si la déplétion sélective des cellules T allo-réactives du donneur par thérapie photodynamique (PDT) à l'aide du 4.5 dibromorhodamine méthyl ester (TH9402) peut prévenir la GVHD *in vivo* dans un modèle de GCSH de souris H-2 incompatible et permettre une reconstitution immunologique efficace.

Ces travaux ont démontré que les cellules T activées retiennent beaucoup plus d'agent photosensibilisateur que les cellules non activées et que la PDT élimine spécifiquement les cellules T (murines) du donneur activées contre les cellules du receveur *in vitro*. Le traitement épargne non seulement les cellules non activées mais préserve aussi leur capacité à générer une réponse cytotoxique et proliférative contre des Ag autres que ceux du CMH de l'hôte. Cette propriété d'élimination sélective des cellules allo-réactives *in vitro* par la PDT se traduit par la prévention de la GVHD *in vivo*. De plus, la PDT élimine spécifiquement les cellules activées tout en conservant la plupart des cellules non activées et donc la réactivité immunitaire contre un tiers ("*third party*"), ce qui est démontré par le développement de la GVHD dans ce dernier groupe. L'analyse de la reconstitution immunitaire a montré que les lymphocytes de souris ayant reçu un greffon allogénique traité et qui ont survécu sans développer de GVHD présentent un phénotype immunologique semblable aux groupes syngéniques, indiquant que les cellules immunitaires sont préservées et fonctionnelles.

Par conséquent, la présente étude démontre que la PDT permet non seulement de dépléter les lymphocytes T allo-réactifs mais induit aussi une reconstitution immunologique satisfaisante des cellules T.

Mots clés : Maladie du greffon contre l'hôte (GVHD). Traitement photodynamique (PDT). Greffe de cellules souches hématopoïétiques. Allogreffe. Reconstitution immunitaire. Cellules T allo-réactives.

Abstract

Graft-versus-host disease (GVHD) and impaired immune reconstitution are the primary obstacles limiting the efficacy of allogeneic stem cell transplantation (SCT). The purpose of this study was to determine whether selective depletion of donor alloantigen-specific T lymphocytes using photodynamic therapy (PDT) would prevent GVHD and enable immune reconstitution in the context of MHC-mismatched SCT. Activated T cells showed preferential retention of this photosensitizer compared to resting lymphocytes, resulting in higher elimination of cytotoxic T-lymphocyte precursors. When lethally irradiated H-2k mice (C3H/HeJ and B10BR) were transplanted with C57BL/6 derived T cell-depleted bone marrow cells supplemented with C57BL/6 derived spleen cells activated with C3H/HeJ targets, they rapidly succumbed to acute GVHD (within 10-47 days). In contrast, both mouse strains receiving histoincompatible C57BL/6 T cells previously exposed to PDT after activation against C3H/HeJ survived more than 100 days post transplantation. Additionally, the same number of treated cells was able to induce GVHD in several different strains of mice. Analysis of immune recovery indicated that T and B cell reconstitution in MHC-mismatched mice transplanted with treated primed cells was similar to that of mice transplanted with treated or control autologous cells indicating that immune cells were preserved and functional. This selectivity of PDT targeting for major histocompatibility complex antigens is highly desirable for the prevention of GVHD. Moreover, the preservation of resting lymphoid populations could explain the rapid immune reconstitution.

Key words: GVHD, photodynamic treatment, alloreactive T cell, third party and immune reconstitution.

TABLE DES MATIÈRES

Sommaire en Français.....	iii
Sommaire en Anglais.....	iv
Table des matières	v
Liste des sigles et abréviations.....	x
Dédicace.....	xii
Remerciements.....	xiii

Première partie : INTRODUCTION

1. Introduction.....	2
1.1. La transplantation et le système immunitaire.....	2
1.2. Les complications liées à transplantation	3
2. La greffe de cellules souches allogéniques.....	4
2.1. Définition de la greffe de cellules souches allogéniques.....	4
2.2. La source de cellules souches hématopoïétiques	4
3. La reconstitution immune après une greffe de moelle osseuse.....	5
3.1. Les granulocytes	6
3.2. Les monocytes /macrophages	6
3.3. Les cellules Natural Killer (NK).....	6
3.4. Les lymphocytes B	7
3.5. Les lymphocytes T	7
4. Déficience immune associée à la greffe de CSH allogénique.....	8
4.1. Une immunodéficience précoce.....	8
4.2. Une immunodéficience tardive.....	9

5. Les bases génétiques de l'alloréactivité.....	10
5.1. Le complexe majeur d'histocompatibilité	10
5.2. Les antigènes mineurs d'histocompatibilité.....	11
5.3. Histocompatibilité et transplantation	12
6. La réaction du greffon contre l'hôte (GVHD).....	13
6.1. Définition.....	13
6.1.1. La GVHD aiguë.....	14
6.1.2. La GVHD chronique.....	14
6.2. Physiopathologie de la GVHD aiguë.....	15
6.2.1. Le régime de conditionnement.....	15
6.2.2. L'activation des cellules T du donneur.....	16
6.2.3. Les effecteurs de l'inflammation.....	17
6.3. La déficience immune associée à la GVHD.....	17
6.3.1. Le thymus et la GVHD.....	18
7. La réaction du greffon contre la leucémie (GVL).....	18
8. Le rejet de greffe (HVG).....	20
9. Traitement et prévention de la GVHD.....	20
9.1. La déplétion des cellules T (TCD).....	21
9.1.1. Avantage de la TCD.....	22
9.1.2. Limites de la TCD.....	22
9.2. Les APC et la prévention de la GVHD.....	24

9.3. Les NK et la GVHD.....	24
9.4. Les lymphocytes T régulateurs.....	25
9.5. La thérapie par gène suicide	25
10. La thérapie photodynamique (PDT).....	26
10.1. Qu'est ce que la thérapie photodynamique?	26
10.1.1. Mécanisme de destruction des cellules cibles.....	26
10.1.2. Les facteurs influençant la réponse des cellules à la PDT.....	27
10.2. Distribution des agents photosensibles.....	27
10.3. Efficacité contre le cancer.....	28
11. La thérapie photodynamique avec le TH9402.....	28
11.1. Efficacité du traitement avec le TH9402 dans l'élimination des cellules immunoréactives humaines.....	29
12. Description du projet de maîtrise.....	30
12.1. Procédure expérimentale.....	30
12.2. Questions générales orientant le projet.....	32
12.3. Stratégies pour répondre aux questions.....	32
Deuxième partie : ARTICLE.....	34

Troisième partie : DISCUSSION	67
I. <u>Pertinence du projet</u>	68
II. <u>Le but du projet</u>	69
III. <u>Discussion des résultats</u>	70
1. Elimination des cellules T alloréactives par PDT.....	70
1.1. Cinétique d'incorporation et d'extrusion du TH9402	71
1.1.1. Accumulation et rétention préférentielle du TH9402 dans les cellules T activées.....	71
1.1.2. Pourquoi il y a une rétention préférentielle dans les cellules activées ? Quel est le rôle de la Pgp ?.....	71
1.1.3. Pourquoi il y a une rétention préférentielle dans les cellules activées ? Un rôle des mitochondries dans cet effet ?.....	72
1.2. Elimination des cellules T du donneur activées contre l'hôte.....	73
1.3. Elimination spécifique des cellules T alloréactives.....	74
2. Prévention de la GVHD dans un modèle H-2 incompatible.....	75
2.1. La PDT élimine les cellules alloréactives et prévient la GVHD.....	75
2.1.1. Prévention de la GVHD dans les souris C3H stimulatrices.....	75
2.1.2. Prévention de la GVHD dans les souris B10BR qui ont le même fond génétiques que les souris stimulatrices.....	76
2.1.3. L'hypothèse du développement d'une GVHD chronique dans certaines souris traitées est-elle possible ?.....	76
2.2. Efficacité du traitement contre le third party.....	77
2.2.1. Réactivité contre un tiers receveur.....	77

2.2.2. La réactivité contre le third party est tardive.....	78
2.2.3. Inhibition temporaire de la réactivité lymphocytaire T.....	79
3. Reconstitutions immune 100 jours post greffe.....	79
3.1. Analyse phénotypiques des lymphocytes T et B.....	79
3.1.1. L'atrophie thymique.....	80
3.1.2. Le phénotype des lymphocytes T dans la rate des souris greffées et normales	81
3.2. Analyse fonctionnelle des cellules T.....	82
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	84
REFERENCES.....	86
ANNEXES.....	98

Liste des sigles et Abréviations:

Ag : Antigène.

Ag miHA : Antigènes mineurs d'histocompatibilité.

BDP : Dérivé Benzoporphyrine ("Benzoporphyrin Derivative").

GM-CFU: "Granulocyte-macrophage colony-forming-unit" .

CPA : Cellule présentatrice d'antigène.

CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité.

CMV : Cytomégalovirus.

CSH : Cellule Souche Hématopoïétique.

EBV : Epstein-Barr Virus.

E-CFU : "Erythroid colony-forming-unit".

G-CSF: "Granulocyte-macrophages colony-stimulating factor".

GM-CSF: "Granulocyte colony-stimulating factor".

GMO : Greffe de Moelle Osseuse.

GVHD: Maladie du Greffon contre l'Hôte ("Graft-versus-host disease").

GVL: Effet du Greffon contre la Leucémie ("Graft-versus-leukemia").

Hi : Marquage d'intensité élevée ("High").

HLA: Antigènes Leucocytaires Humains ("Human Leukocyte Antigen").

HVG: Effet de l'Hôte contre leGreffon ("Host-versus-graft").

Ig : Immunoglobuline.

IL-1: Interleukine-1.

IL-2: Interleukine-2.

IL-6: Interleukine-6.

IL-7: Interleukine-7.

Int: Marquage d'intensité Intermédiaire ("Intermediate").

LMC : Leucémie myéloïde chronique.

Lo : Marquage de faible intensité ("Low").

LPD : "Lymphoproliferative disease".

MDR : "Multi drug resistance".

MLC : Culture lymphocytaire mixte ("Mixed-Lymphocyte-culture").

NK : Cellules "Natural Killer".

pCTL : "Cytotoxic lymphocyte precursor".

PDT : Traitement photodynamique ("Photodynamic treatment").

PgP : Glycoprotéine P.

pHTL : "Helper lymphocyte precursor".

TCD : Déplétion des cellules T ("T-cell-depletion").

TCR : Récepteur des lymphocytes T ("T-cell-Receptor").

TH9402 : 4,5-dibromorhodamine méthyl ester.

TNF: "Tumor necrosis factor".

VRV : Varicella Zooster Virus.

*A mon époux Rafik et à mes parents
pour leur confiance inébranlable en moi.*

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier sincèrement le Dr Denis-Claude Roy pour m'avoir accepté dans son équipe de recherche et m'avoir permis de travailler sur un sujet aussi passionnant. Je suis reconnaissante de la confiance et du support qu'il m'a témoigné aux cours de ces deux années.

Je voudrais souligner, particulièrement, la disponibilité de Gorazd Krosl, Claude Perreault, Nathalie Labrecque, Martin Guimond, pour leurs nombreux conseils. J'aimerais remercier Marie-Pier Giard pour le support technique, particulièrement pour les greffes de moelle osseuse et tous les membres du laboratoire pour leur disponibilité. J'aimerai souligner l'apport de la compagnie Thera technologie dans l'établissement de ce projet.

Finalement, je remercie mon époux Rafik pour son soutien moral et intellectuel et sa confiance inébranlable en moi.

Première partie
INTRODUCTION

1. Introduction

La greffe de moelle osseuse (GMO) représente une intervention thérapeutique particulièrement intéressante pour de nombreux patients atteints de maladies mortelles telles l'aplasie médullaire sévère, les leucémies aiguës, la leucémie myéloïde chronique et diverses maladies congénitales touchant les cellules lymphoïdes et/ ou myéloïdes.

Il s'agit d'une procédure complexe, visant au remplacement des cellules de la moelle osseuse dans le cas d'une leucémie et/ou d'un système immunitaire défectueux, par des cellules souches hématopoïétiques (CSH). Ces CSH remplaceront définitivement toutes les cellules de la lignée myéloïde et lymphoïde du receveur. En général, elle comprend une étape de conditionnement qui a pour objectif de détruire la moelle du receveur (traitement myéloablatif) et de permettre la prise du greffon. Le devenir de ce greffon dépendra ensuite essentiellement de la réaction immunologique du receveur vis-à-vis des antigènes de transplantation propres au donneur et qui sont portés par le greffon, tels que les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) ou HLA pour "Human Leucocyte Antigen" et les antigènes mineurs d'histocompatibilité (Ag miHA) ¹.

Aussi, on pourra distinguer plusieurs types de greffes ; on parlera d'autogreffe lorsque donneur et receveur sont le même individu, de greffe syngénique lorsqu'ils sont génétiquement identiques (jumeaux) et d'allogreffe lorsqu'ils sont génétiquement différents mais de la même espèce.

1.1. La transplantation et le système immunitaire

La transplantation de cellules hématopoïétiques conduit à des perturbations majeures de la réponse immune. Les doses élevées du régime de chimiothérapie et de radiothérapie utilisées pour préparer le receveur à la transplantation conduit à une élimination des CSH endogènes et des progéniteurs ainsi qu'à une perte d'une partie significative des cellules matures et différenciées. Ainsi, toutes les lignées hématopoïétiques sont affectées et la reconstitution immune post transplantation dépendra de la capacité du greffon hématopoïétique à générer des cellules lymphoïdes et

myéloïdes *de novo* mais aussi de la fonction des cellules matures présentes dans le greffon.

1.2. Les complications liées à la transplantation

Que ce soit dans les greffes autologues ou les greffes allogéniques, la forte dose de chimiothérapie avec ou sans radiothérapie permet non seulement une élimination des cellules malignes mais aussi une ablation de la moelle osseuse. Ce conditionnement va aussi causer des lésions au niveau de tissus comme les muqueuses gastro-intestinales, la peau, les tissus lymphoïdes et l'épithélium thymique ². Cependant, au cours de la greffe de CSH allogéniques, d'autres complications attribuables à des conflits immunologiques bidirectionnels ont été observées. En effet, d'une part, les lymphocytes T du greffon peuvent attaquer l'hôte, provoquant ainsi une complication grave et souvent mortelle que l'on nomme **la maladie du greffon contre l'hôte ("graft-versus-host disease" ou GVHD)** et d'autre part, les cellules lymphoïdes de l'hôte peuvent rejeter le greffon médullaire et on parlera alors d'un effet de l'hôte contre le greffon ("Host-versus-graft" ou HVG).

Plusieurs tentatives de prévention de la GVHD ^{3,4} ont été entreprises notamment par la déplétion des lymphocytes T. Cependant l'élimination des cellules T du greffon de cellules souches est souvent associée à une dysfonction immune et/ou à la rechute leucémique ⁵. En effet, en plus d'être responsables de la GVHD, les lymphocytes T présents dans le greffon contribuent à la reconstitution immune à long terme et à l'élimination des cellules leucémiques résiduelles et on parlera ainsi de l'effet du greffon contre la leucémie (GVL ou "*graft-versus-leukemia effect*") ⁶.

Au cours de mon projet de maîtrise, nous avons proposé une stratégie permettant d'éliminer les cellules T alloréactives du donneur qui réagissent spécifiquement contre le receveur, et qui sont contenues dans le greffon de cellules souches du donneur, dans le but de prévenir une GVHD létale. De plus, nous avons évalué la propriété d'une telle thérapie cellulaire à permettre une reconstitution immune à long terme dans un modèle murin allogénique. Cet objectif a été atteint grâce à l'utilisation d'une thérapie photodynamique (PDT) à l'aide du 4,5-dibromorhodamine méthyl ester (TH9402).

2. La greffe de cellules souches allogéniques

2.1. Définition de la greffe de cellules souches allogéniques

Une greffe de cellules souches hématopoïétiques allogéniques constitue souvent un traitement de choix pour plusieurs hémopathies malignes comme la leucémie aiguë ou la leucémie myéloïde chronique (LMC). Elle a pour but l'éradication du clone malin grâce aux réactions immunologiques inhérentes à l'installation de CSH du donneur chez l'hôte. L'allogreffe demeure une approche complexe réservée à un nombre restreint d'individus notamment à cause de la difficulté à identifier des donneurs potentiels. En effet, le greffon provient généralement d'un donneur soit apparenté (frère ou sœur), soit non-apparenté mais HLA compatible. Non seulement il est difficile de trouver des donneurs HLA compatibles, mais plus les patients seront âgés et plus ils sont à risque élevés de GVHD.

2.2. La source de cellules souches hématopoïétiques :

Il existe trois sources de CSH :

- *Le greffon médullaire :*

Pendant longtemps, la majorité des allogreffes était réalisée à partir de greffons médullaires. En effet, la moelle osseuse étant le siège principal de l'hématopoïèse, elle génère des millions de cellules matures quotidiennement afin de maintenir un nombre normal de cellules sanguines tout au long de la vie d'un individu.

- *Le greffon de sang périphérique :*

Un greffon de CSH peut être obtenu par prélèvement sanguin après mobilisation par des facteurs de croissance hématopoïétiques. Les facteurs de croissance hématopoïétiques permettent, en effet, le passage des CSH de la moelle osseuse vers le sang. Ce type de greffon peut contenir en moyenne quatre fois plus de cellules souches (CD34⁺) et dix fois plus de lymphocytes T qu'un greffon médullaire. Ce type de greffe,

par sa grande accessibilité et le peu d'effets secondaires est de plus en plus utilisé en clinique ⁷.

- *Le greffon de sang placentaire :*

Les cellules du sang de cordon ombilical peuvent être prélevées à la naissance et congelées. Bien que le nombre de cellules nucléées soit relativement faible dans le sang placentaire, les CSH du sang placentaire ont une capacité de prolifération et d'expansion excessivement grande, beaucoup plus importante que celles de l'adulte. Ces cellules du sang de cordon sont par ailleurs plus immatures, ce qui permet de réaliser des allogreffes avec une compatibilité HLA incomplète. Par contre, leur utilisation est limitée par le poids du receveur. En effet, on estime qu'une quantité de 3×10^7 cellules nucléées/kg est nécessaire à la prise de greffe. Pour cette raison, les greffes de sang placentaire sont principalement réalisées chez des enfants.

3. La reconstitution immune après une greffe de moelle osseuse

Pour une période variable, indépendante du type de greffon de moelle osseuse, le système immunitaire inné et acquis reste profondément altéré après une GMO. Le rétablissement d'une immunité complète est habituellement prolongé et il faudra plusieurs mois à plusieurs années avant qu'un système immunitaire complet ne se développe ^{8,9}. Après une allogreffe, les CSH dérivées du donneur finissent par reconstituer un système immunitaire fonctionnel ¹⁰, alors que dans le cas d'une autogreffe, le propre système immunitaire de l'hôte subit un nouveau processus d'ontogenèse ¹¹. Le rétablissement immunitaire sera confronté à plusieurs éléments tels que les infections, l'immunité résiduelle de l'hôte qui est quelque fois capable de établir une réponse allogénique efficace et contribuer ainsi au rejet de greffe ^{12,13}, mais aussi la GVHD et immunosuppresseurs employés pour prévenir la GVHD. Nous allons faire un bref rappel du rétablissement des principales composantes du système immunitaire.

3.1. Les granulocytes

Au cours des deux premières semaines suivant la greffe, la plupart des patients traversent une période de granulocytopenie absolue avec une absence virtuelle de cellules circulantes, puis les granulocytes sont à nouveau produits. L'utilisation de facteurs de croissance hématopoïétiques peut permettre d'accélérer le rétablissement des granulocytes et raccourcir la période de granulocytopenie ^{14,15}.

3.2. Les monocytes /macrophages

Les monocytes/macrophages recouvrent une capacité fonctionnelle plus rapidement que la majorité des autres lignées cellulaires. En effet, les monocytes dérivés du donneur deviennent détectables dans le sang périphérique durant les premiers mois suivant la transplantation. Les macrophages issus du tissu de l'hôte seront remplacés par ceux du donneur dans les premiers mois post greffe et les cytokines dérivées des monocytes telles que l'interleukine (IL)-1, IL-6 et le "tumor necrosis factor" (TNF) pourront être induits au bout de 10 à 14 jours suivant la transplantation ¹⁶. Cependant, malgré un rapide rétablissement de la plupart des fonctions critiques des cellules de la lignée monocyte/macrophage (incluant la présentation antigénique et la sécrétion de cytokines), quelques anomalies ont été observées dans la période précoce de la greffe. En effet, une diminution de l'adhérence des monocytes, bien que statistiquement non significative, a été notée chez les patients avec une GVHD aiguë ¹⁷. Cette anomalie peut être en partie responsable de la prédisposition, dans certains cas, à des infections pulmonaires par le cytomégalovirus (CMV) et le *pneumocystis carinii*.

3.3. Les cellules "Natural Killer" (NK)

Définis comme des lymphocytes granuleux de grande taille ("large granular lymphocytes") non restreints par le CMH, les cellules NK ont un phénotype CD3⁺ et souvent un phénotype CD56⁺ et CD16⁺. Elles sont parmi les premières cellules à

émerger après une GMO et elles exercent plusieurs fonctions immunologiques et homéostatiques *in vivo* et *in vitro* en plus de leur fonction anti-tumorale ^{11,18,19}.

3.4. Les lymphocytes B

Le nombre absolu de lymphocytes B circulants devient normal 4 à 8 mois après la GMO et un peu plus tôt pour les greffes autologues que pour les greffes allogéniques ^{20,21}. Cependant, la normalisation du nombre de cellules B ne se reflète pas dans leur fonction. Durant la phase précoce de la transplantation, la lymphopoïèse des cellules B se caractérise par un déséquilibre clonal des immunoglobulines (Ig) et une dissociation entre les Ig du sérum et le niveau spécifique d'Ac ²².

3.5. Les lymphocytes T

Le nombre de lymphocytes T périphériques ne se normalise pas avant 3 à 12 mois post-GMO ^{8,23} et le rétablissement fonctionnel de ces cellules est encore plus long ^{24,25}. Des études réalisées *in vitro* montrent qu'après une GMO, les cellules T présentent une réponse proliférative réduite en réponse à un stimulus mitogénique, une fonction effectrice des cellules T cytotoxiques anormale et une capacité à collaborer avec les cellules B qui est diminuée ²⁶⁻²⁸.

Plusieurs raisons pourraient expliquer le fait que l'immunité via les cellules T puisse être insuffisante alors que toutes les autres lignées hématopoïétiques sont fonctionnelles. Les cellules souches produisent seulement des cellules T précurseurs et contrairement aux autres cellules hématopoïétiques, les lymphocytes T ont encore à subir un processus de maturation extensive dans le thymus avant d'acquérir leur pleine fonction ²⁹.

En effet, suite à une GMO, la régénération des populations T survient par les deux voies dépendantes et indépendantes du thymus ³⁰⁻³². La voie conventionnelle, dépendante du thymus, implique une sélection positive et/ou négative des cellules dans le thymus et produit des populations T avec un répertoire du récepteur des lymphocytes T (TCR) "T-cell-Receptor" diversifié. Au contraire, la voie indépendante du thymus est associée à une reconstitution des cellules T via une expansion périphérique des

lymphocytes T matures infusés avec le greffon hématopoïétique produisant donc des cellules T avec une diversité du TCR limitée³³. Cette voie de régénération des cellules T sera limitée dans sa capacité de restaurer une compétence immune complète chez l'hôte. Etant donné que les cellules T matures ne contiennent pas un répertoire assez large pour répondre à un antigène quelconque, le risque d'infection restera significatif malgré une proportion normale de cellules T dans le sang. Des répertoires T déséquilibrés ont notamment été observés après plusieurs traitements affectant la viabilité des lymphocytes et chez des patients transplantés avec un greffon déplété en cellules T^{29,34}. Il existe une troisième voie, aussi indépendante de la régénération thymique mais qui est cependant limitée et associée à la production d'un faible nombre de cellules T extrathymiques à partir de la moelle osseuse et de l'intestin³⁵⁻³⁸.

4. Déficience immune associée à la greffe de CSH allogénique

4.1. Une immunodéficience précoce:

La procédure de transplantation cause une déficience immune sévère conduisant à de nombreuses infections qui sont dangereuses pour le rétablissement du patient. Ces infections surviennent durant les premières semaines après la greffe et sont dues au fait que la plupart des lignées hématopoïétiques ne sont pas encore reconstituées. Tous les moyens de défense du système immunitaire sont donc encore déficients. En effet, durant les 2 à 4 semaines suivant la chimiothérapie et la radiothérapie ablative, le système sanguin est sévèrement perturbé et ceci jusqu'à ce que de nouveaux éléments provenant des cellules souches du donneur soient formés. Les globules rouges et les plaquettes peuvent être maintenus par transfusion, mais la plupart des risques sévères impliquent des infections bactériennes par manque de granulocytes. Dans ces cas, la transfusion granulocytaire est peu utilisée, car les neutrophiles ont une courte durée de vie et leur transfusion est associée à des effets secondaires très graves, par contre, il sera possible d'avoir une accélération de la production de nouveaux granulocytes. L'administration au patient de facteurs de croissance recombinants comme le facteur de stimulation des

colonies granulocytes ("Granulocyte colony- stimulating factor" ou G-CSF) va stimuler la prolifération et la différenciation des cellules précurseurs des granulocytes.

4.2. Une immunodéficience tardive

La persistance de la dysfonction immune complique la greffe de moelle osseuse allogénique et peut résulter en une mortalité tardive reliée à des infections opportunistes, particulièrement chez les patients avec une GVHD chronique ^{30,39-43}. En effet, les patients ayant reçu une allogreffe seront susceptibles d'être infectés par des virus tels que le cytomégalo virus, le virus varicella zoster (VRV), l'Epstein- Barr virus (EBV), le virus de l'herpes simplex virus ou pneumocystis carinii pendant des mois voir même des années après la GMO ⁹. Il semble que la nature virale ou fongiques des infections retrouvées chez les patients qui survivent longtemps après la procédure de greffe de CSH soit souvent associée à une déficience des cellules T ^{23,44-47}.

- **Le thymus**

Un thymus fonctionnel est crucial pour une reconstitution immune efficace après une allogreffe, en particulier en ce qui concerne la réémergence de cellules T CD4 naïves ^{30,48-50}. Des études récentes montrent un délai dans le rétablissement immunitaire chez un adulte recevant une greffe par rapport à un enfant, ceci même en absence de GVHD, particulièrement dans les transplantations à partir de fond génétique différents ("*mismatch*") ou non apparentées. Bien qu'il soit évident que les tissus thymiques puissent fonctionner à un âge avancé, une relation inverse claire existe entre la production thymique et l'âge ^{23,51-53}. Ainsi, le dommage thymique dû à l'âge avancé, la chimiothérapie antérieure et les effets de la radiation contrecarrent la reconstitution immunitaire particulièrement chez les individus plus âgés.

Les efforts pour améliorer la thymopoïèse après la greffe ont été limités par un manque d'agents thérapeutiques efficaces. Des modèles murins suggèrent que les

hormones de croissance et leur médiateurs pourraient être utilisés pour accélérer la reconstitution immunologique T mais de telles études cliniques n'ont pas encore été exécutées. Récemment, des études ont montré que l'IL-7, une glycoprotéine de 25kb sécrétée par les cellules stromales de la moelle osseuse et du thymus est capable non seulement de stimuler la néogenèse des cellules T et B, mais d'augmenter la reconstitution immunitaire dans des souris sans GVHD ⁵⁴⁻⁵⁷.

5. Les bases génétiques de l'alloréactivité

Le greffon hématopoïétique qu'il soit d'origine médullaire, sanguine ou placentaire, comprend, d'une part, des cellules souches capables de reconstituer de façon durable l'hématopoïèse complète et d'autre part, des cellules immunocompétentes, telles que les lymphocytes T, susceptibles de reconnaître l'hôte comme étranger. Cette réactivité allogénique due à la disparité d'histocompatibilité entre le donneur et le receveur est responsable de réactions immunologiques réciproques du greffon contre son nouvel hôte et de l'hôte contre le donneur.

Les bases moléculaires de cette alloréactivité à la fois délétère (GVH, HVG) et bénéfique (GVL) restent aujourd'hui encore imparfaitement comprises. Il semble néanmoins que le système humain HLA et les antigènes mineurs d'histocompatibilité soient cruciaux dans le développement de ces réactions ⁵⁸.

5.1. Le complexe majeur d'histocompatibilité :

Le complexe majeur d'histocompatibilité est un complexe multiallélique et multigénique hautement polymorphique jouant un rôle central dans la réponse immunitaire humorale et à médiation cellulaire. C'est un ensemble de gènes étroitement liés. Chez l'humain, il est localisé sur le bras court du chromosome 6 à la position p21 et il est nommé HLA. Ces loci sont regroupés en deux classes. Les molécules HLA de classe I (HLA-A, B et C) ont une large distribution et sont localisées à la surface de toutes les cellules nucléées alors que les Ag HLA de classe II (DR, DQ et DP) sont retrouvés plus sélectivement au niveau des cellules du système immunitaire (cellules dendritiques,

lymphocytes B, lymphocytes T activées, les macrophages) ⁵⁹⁻⁶¹. Chez la souris, on parlera du complexe H-2 et les principales molécules du CMH de classe I sont K, D, L et celles de classe II sont I-A et I-E. De plus, on désigne par le terme haplotype, le fond génétique de la souris représenté souvent par la lettre en exposant (par exemple H-2^k).

Les molécules HLA sont fondamentales pour l'activation des cellules T. Elles vont se lier aux peptides et les présenter aux cellules T. Les molécules HLA de classe I présentent préférentiellement les peptides aux cellules T CD8⁺, alors que les lymphocytes T CD4⁺ reconnaissent préférentiellement les peptides présentés par les HLA de classe II. Les molécules HLA sont elles-mêmes appelées antigènes majeurs d'histocompatibilité et les cellules T, lorsqu'elles sont confrontées à des molécules HLA non identiques, réagissent de manière très forte, ce qui peut conduire à une GVHD après une allogreffe. Les peptides présentés par les molécules HLA, peuvent venir d'une source externe (par exemple un virus) et seront présentés par les classe I, mais dans la majorité des cas, ils dérivent de protéines endogènes et seront présentés par les classe I ou II.

Durant la maturation normale du système immunitaire, une tolérance aux protéines du soi se développe. Cependant dans le contexte de la transplantation de CSH, le polymorphisme de ces protéines endogènes sert de source d'antigènes mineurs d'histocompatibilité et forme la base de la non-identité immunologique entre individus qui sont HLA compatible, même s'ils sont apparentés ⁶².

5.2. Les antigènes mineurs d'histocompatibilité

Les antigènes mineurs d'histocompatibilité (Ag miHA) sont des peptides dérivés de protéines endogènes présentés par les molécules du CMH aux cellules T du donneur ⁶³. Le polymorphisme génétique des protéines cellulaires endogènes représente Ag miHA. Les antigènes mineurs sont critiques pour la GMO allogénique, il a en effet été montré que les cellules T ne reconnaissent pas l'antigène seul mais plutôt en conjonction avec des molécules de CMH présentes à la surface des cellules présentatrice d'antigène (CPA) ⁶⁴. Les molécules du CMH comptant une seule ouverture là où l'interaction prend place, agissent comme récepteur pour l'Ag. Ce complexe peptide-CMH exprimé à la

surface de la CPA est reconnu par le TCR présenté par la cellule T. Pour cette raison, l'alloréactivité se définit comme étant la reconnaissance de différents peptides du non-soi par le TCR et portés par le CMH du receveur plutôt que par les molécules elles même.

Après la présentation des Ag miHA (peptides étrangers) par le CMH aux cellules T du donneur, c'est à dire les lymphocytes T $CD4^+$ dans le contexte des molécules de CMH de classe II et les $CD8^+$ pour les molécules de classe I, la présence des peptides du soi liés aux molécule de CMH déclenche la réponse des cellules T et l'induction de la GVHD.

5.3. Histocompatibilité et transplantation :

L'étendue de l'histocompatibilité entre le donneur et le receveur permet de distinguer plusieurs types de greffes; d'une part, les greffes HLA identiques sur un plan génotypique (greffe HLA identique intra-familiale) dans lesquelles les éléments d'incompatibilité tissulaire se retrouvent au niveau des antigènes mineurs d'histocompatibilité et d'autre part, les greffes HLA identiques sur un plan phénotypique (la plupart du temps il s'agit d'un donneur en dehors de la famille). Également, on retrouve des greffes HLA non-identiques qui se caractériseront quant à elles, par des incompatibilités dominées par des différences au niveau du CMH. Cette non identité immunologique entre le donneur et le receveur est à la base de la GVHD.

En effet, lorsque le donneur et le receveur ne sont pas HLA identiques, les cellules T du donneur reconnaîtront les Ag majeurs de l'hôte comme étrangers et la réaction du greffon contre l'hôte (GVH) qui en résulte, pourra être dramatique. Par contre, quand le donneur et le receveur sont identiques au niveau du CMH ; la GVHD se fera à travers la reconnaissance par le TCR des cellules T d'Ag mineurs liés au même CMH.

6. La réaction du greffon contre l'hôte (GVHD)

6.1. Définition

En 1955, Barnes *et al.* ⁶⁵ rapportent une maladie dite «secondaire» comportant une cachexie, une diarrhée, un érythème et une splénomégalie. Cette maladie d'évolution mortelle, survenait chez des souris irradiées recevant des splénocytes irradiés. Billingham *et al.* ⁶⁶ décrivent par la suite trois pré-requis pour le développement de cette réaction du greffon contre l'hôte : la présence de cellules immunocompétentes dans le greffon, l'incapacité pour l'hôte à rejeter les cellules administrées et un certain degré d'incompatibilité entre le donneur et le receveur.

La GVHD est donc la conséquence de la reconnaissance par les lymphocytes T du greffon d'alloantigènes (antigènes majeurs ou mineurs d'histocompatibilité) présents dans le receveur. C'est une complication de l'allogreffe responsable d'une forte morbidité et mortalité particulièrement dans les situations d'incompatibilité HLA. En effet, 25 à 40 % des patients allogreffés avec des cellules provenant de frères ou de sœurs HLA identiques vont en mourir, alors que ce taux atteint 40 à 80 % dans le cas d'allogreffes réalisées à partir de donneurs non apparentés. Cette faible survie est souvent due aux effets directs de la maladie et aux conséquences de l'immunosuppression employée pour la traiter ⁶⁷. Les méthodes conventionnelles pour prévenir la GVHD comptent sur la combinaison d'anti-métabolites tels le méthotrexate, administrés juste après la greffe pour altérer les cellules T du donneur qui répondent fortement aux Ag de l'hôte, en association avec la cyclosporine. Cette dernière bloque les voies de transduction du signal calcium-dépendant suite à l'engagement du TCR.

La GVHD peut être classifiée en deux types, aiguë et chronique, selon le temps de développement et d'apparition des signes cliniques.

6.1.1. La GVHD aiguë

La GVHD aiguë se manifeste en général dans les deux premiers mois suivant la greffe et affecte principalement la peau (érythèmes, épidermolyse), le tractus gastro-intestinal (stomatites, diarrhées) et le foie (choléstase et cytolyse).

Lorsqu'un traitement pharmacologique immunosuppresseur est utilisé comme prophylaxie de la GVHD après une transplantation myéloablatrice, 25% à 60 % des patients allogreffés à partir d'un donneur compatible apparenté HLA-identique présentent une GVHD aiguë grade II-IV et jusqu'à 45 à 80% dans le cas donneurs non apparentés ⁶⁸⁻⁷⁰.

Au cours de notre étude nous nous intéresserons principalement à la GVHD aiguë et à la façon dont on pourrait la prévenir ou limiter son incidence dans une GMO allogénique murine H-2 incompatible.

6.1.2. La GVHD chronique

La GVHD chronique commence plus tard, soit au moins 100 jours post-greffe et peut toucher pratiquement tous les tissus et organes à l'exception du myocarde et des reins. Ses manifestations sont très polymorphes, prenant l'apparence de diverses maladies auto-immunes comme la sclérodermie, le lupus érythémateux disséminé, le syndrome de Sjögren, la myasthénie grave et le purpura thrombopénique auto-immun ⁷¹. Elle se caractérise par l'apparition fréquente d'auto-anticorps (anti ADNss, ADNds, antigènes nucléaire) comme dans les maladies auto-immunes dites «spontanées».

En dépit des agents immunosuppresseurs, approximativement 30 à 50% des patients développeront une GVHD chronique après une greffe myéloablatrice de cellules souches HLA-identique. Son incidence peut être encore plus forte après une allogreffe de cellules souches du sang périphérique ⁷². Dans certains cas, la GVHD chronique se résout spontanément mais elle requiert souvent un traitement immunosuppresseur prolongé et sera associée à une mortalité et une morbidité significative. Ainsi, plus de 50% des patients atteints d'une GVHD chronique étendue vont mourir des suites d'une infection résultant d'une dysfonction immune sévère ⁷³.

Les GVHD aiguë et chronique sont souvent liées et la plupart des patients qui présentent une GVHD chronique avaient développé auparavant une GVHD aiguë.

6.2. Physiopathologie de la GVHD aiguë

La physiopathologie de la GVHD aiguë peut être considérée comme une distorsion de la réponse cellulaire à une infection virale ou bactérienne. Les principales cibles de la GVHD suggèrent une relation étroite entre l'infection et la GVHD. La peau, l'intestin et le foie sont tous exposés de manière extensive aux endotoxines et à d'autres produits bactériens qui peuvent déclencher et amplifier une inflammation locale. En raison de leur situation en tant que barrières primaires à l'infection, ces organes cibles sont infiltrés de grandes quantités de CPA, telles que les macrophages et les cellules dendritiques qui peuvent amplifier la réaction du greffon contre l'hôte. Ainsi, une des principale hypothèse physiopathologique considère trois phases séquentielles dans le développement de la GVHD.

6.2.1. Le régime de conditionnement

La phase la plus précoce de la GVHD aiguë se prépare avant que les cellules du donneur soient infusées. En effet, le conditionnement est une variable importante dans la pathogenèse de la GVHD aiguë, car il peut endommager et activer les tissus de l'hôte, incluant la muqueuse intestinale, le foie et d'autres tissus ⁷⁴. Les cytokines inflammatoires comme le TNF et l'IL-1 ⁷⁵, ainsi que des facteurs de croissance comme le granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) ⁷⁶ sont alors relâchés des tissus de l'hôte en réponse aux dommages causés par le régime de conditionnement pré-transplantation, c'est le début de la tempête cytokines ("cytokines storm"). La présence de ces cytokines inflammatoires durant cette phase peut amener un surexpression des molécules d'adhésion ⁷⁷ et des antigènes du CMH ⁷⁸.

6.2.2. L'activation des cellules T du donneur

□ *Adhésion et costimulation des cellules T*

Après que le greffon cellulaire soit infusé, la reconnaissance du CMH de l'hôte et/ou des Ag miHA par les cellules T matures du donneur sera augmentée. Les alloantigènes seront présentés par les molécules CMH de classe I et II et stimuleront la différenciation des lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺. Suite au premier contact CMH-antigène-TCR, les molécules de costimulation et d'adhésion (CD40, CD28, CD4, CD8, LFA-1, LFA-2, CD44) vont à leur tour jouer un rôle important dans le phénomène d'activation lymphocytaire.

Des Ac monoclonaux bloquant l'interaction des molécules d'adhésion avec leur ligand, pourraient physiquement empêcher la dimérisation du TCR, du CMH ainsi que des voies de signalisation subséquentes. De plus, l'absence de molécules de costimulation conduit à un signal de désactivation qui mène à l'anergie. L'utilisation d'un anticorps anti-CTLA-4 (récepteur de la molécule de costimulation B7 présent sur la cellule T) pour bloquer l'interaction CD28/B7 s'est cependant avérée décevante en phase clinique ⁷⁹. Des études cliniques de deuxième génération évaluent encore l'efficacité de cette approche.

□ *Les cytokines générées par les cellules T*

Ces différentes interactions du TCR avec le complexe CMH-peptide ainsi que les interactions entre les molécules d'adhésion et leurs récepteurs entraînent par la suite des modifications biochimiques intracellulaires conduisant à une activation de protéines kinases C et tyrosine kinase. Ces phénomènes aboutissent à une transcription des gènes de l'IL-2, de l'interféron (INF)- γ et de leur récepteurs. Les cytokines produites en réponse à une stimulation par des alloantigènes sont principalement de type Th1 (INF- γ , IL-2) et sont des médiateurs critiques de la GVHD aiguë. Le blocage de l'IL-2 avec des

Ac dirigés contre la molécule elle-même ou son récepteur, peut inhiber le développement de la maladie expérimentale.

Ces cytokines vont jouer un rôle central dans l'activation, la prolifération et l'induction de la cytotoxicité, dans la réponse des cellules NK et dans l'activation des cellules phagocytaires de l'hôte et du donneur aboutissant à la sécrétion d'autres cytokines IL-1 et de TNF α qui vont contribuer à prolonger la durée de la tempête de cytokines.

6.2.3. Les effecteurs de l'inflammation

La troisième phase de la physiopathologie de la GVHD est la plus complexe. Les lymphocytes T cytotoxiques ne sont probablement pas responsables de la totalité des atteintes tissulaires observées. Dans plusieurs modèles animaux, il a été démontré que les cellules NK étaient également des effecteurs importants de la GVHD. Les lymphocytes T cytotoxiques et les cellules NK induisent ainsi l'apoptose des cellules cibles ⁸⁰. Les cellules phagocytaires, stimulées par les cytokines ou par des lipopolysaccharides (LPS) (libérés par les muqueuses intestinales de l'hôte lésées par le conditionnement), sécrètent des cytokines de l'inflammation (IL-1 et du TNF α). Le TNF α peut induire directement la nécrose des cellules cibles ou intervenir dans les phénomènes d'apoptose. Par ailleurs le monoxyde d'azote, produit par les macrophages activés, est également responsable des lésions des tissus cibles de la GVHD.

6.3. La déficience immune associée à la GVHD :

L'une des premières caractéristiques de la GVHD est une déficience immune profonde et durable. Des observations cliniques et des données expérimentales, ont montré que trois principaux facteurs pouvaient contribuer à cette déficience immune : la déplétion et l'anergie des lymphocytes mature réactifs contre l'hôte, la suppression non spécifique de la fonction des lymphocytes et la lymphopoïèse déficiente des population de cellules T et B. De plus, il est important de mentionner que la présence de la GVHD affecte de manière uniforme le degré de rétablissement immun. En effet, une GVHD

active favorise les dommages au micro-environnement thymique et lymphoïde et gêne considérablement le rétablissement post-greffe des cellules T et de B.

6.3.1. Le thymus et la GVHD

L'ontogénie thymique est sévèrement perturbée par la GVHD. Les analyses histologiques et les études fonctionnelles des GMO cliniques et expérimentales ont montré que les cellules épithéliales thymiques, les cellules du stroma thymique dérivées de la moelle osseuse et les thymocytes sont des cibles de la GVHD aiguë^{54,81-83}. De plus, la maladie thymique expérimentale induite par la GVHD mène à une perte de la sélection d'un répertoire thymique normal^{54,81,84,85}.

La dysfonction thymique suite à la maladie du greffon-contre-l'hôte est ainsi susceptible de contribuer à la période de profonde immunodéficience⁸⁶. De plus, l'une des caractéristiques de la GVHD thymique est un changement dans la composition des différentes sous-populations de thymocytes. Cependant, le mécanisme précis responsable de la déplétion des thymocytes immatures (en particulier les cellules T doubles positives CD4⁺CD8⁺) n'a pas été encore bien défini.

7. La réaction du greffon contre la leucémie (GVL)

La notion que l'alloréactivité puisse relayer un effet antileucémique revient à Barnes *et al.*⁶⁵ avec des études *princeps* démontrant une éradication de la leucémie dans des souris irradiées ayant reçu une GMO allogénique alors que ce n'était pas le cas pour la greffe de moelle syngénique à partir de jumeaux identiques. L'importance de cet effet GVL est maintenant bien établie chez l'homme avec la démonstration que le taux de rechute leucémique était moindre chez des patients présentant une GVHD aiguë et /ou chronique⁸⁷. Cependant, cet effet GVL peut être observé même en l'absence de GVH clinique (mais de façon moins explicite) comme l'indique le taux de rechute plus élevé après une greffe allogénique comportant une déplétion de lymphocytes T^{6,88}.

Donc, on peut dire que l'effet GVL nécessite une disparité allogénique et des lymphocytes matures dans le greffon. De plus, il sera potentialisé par la survenue de la GVHD.

La GVL est-elle séparable de l'effet GVH ?

Une des stratégies permettant de séparer de manière efficace les réactions anti-tumorale et anti-hôte repose sur la mise en évidence d'Ag pouvant servir de cibles pour la thérapie impliquant les cellules T. Deux grandes catégories de cibles sont actuellement à l'étude : les Ag miHA polymorphiques et les Ag associés au phénotype malin (Ag « mutationnel » comme Bcr /abl, la translocation caractéristique des leucémies myéloïdes chroniques (LMC)).

Comme l'ont montré des études antérieures, l'effet GVL peut survenir en l'absence de GVHD, indiquant qu'une sous-population de l'Ag miHA exprimée par les cellules leucémiques et reconnue par les cellules T du donneur n'est pas exprimée sur les tissus non hématopoïétiques cibles de la GVHD. Ainsi, une des principales stratégies pour séparer la GVL de la GVHD est l'identification des antigènes mineurs d'histocompatibilité polymorphiques qui seront différemment exprimés sur les tissus hématopoïétiques et non hématopoïétiques. De tels Ag devraient pouvoir servir de cibles pour la thérapie cellulaire suite à une transplantation afin d'éliminer les cellules lympho-hématopoïétiques malignes de même que les cellules hématopoïétiques normales de l'hôte.

En conclusion, il est probable que la réponse immune dépende principalement de la nature de l'antigène en cause. Si l'antigène impliqué dans l'effet GVL est spécifique de la cellule tumorale ou correspond à un Ag miHA dont l'expression est restreinte au tissu hématopoïétique, les effets GVL et GVH seront potentiellement distincts et séparés. En revanche, si l'antigène reconnu lors de l'effet GVH est un antigène mineur (ou majeur) d'expression ubiquitaire, l'effet GVL sera proportionnel à l'intensité de la GVHD. Chez un patient, il est probable que l'effet GVL résulte de la reconnaissance à des degrés divers de ces trois types d'antigènes et de la qualité de ces interactions immunologiques.

8. Le rejet de greffe (HVG)

Le rejet de greffe est dû à la persistance, après le conditionnement, de lymphocytes T de l'hôte capables de s'activer et de rejeter le greffon. Cette persistance des lymphocytes T peut être liée à la non prise du greffon, c'est-à-dire à l'absence d'implantation initiale de l'hématopoïèse. Il a été démontré par l'étude du polymorphisme de l'ADN qu'il existait alors, temporairement, un chimérisme mixte, c'est-à-dire une cohabitation des cellules hématopoïétiques de l'hôte et du donneur ⁸⁹.

La non-prise du greffon et le rejet de greffe sont des complications très rares (moins de 2%) après une GMO HLA-identique conventionnelle utilisant un conditionnement myéloablatif et en l'absence de manipulation *ex vivo* du greffon. Par contre, elles seront favorisées par 1) la disparité HLA entre donneur et receveur ⁹⁰, 2) l'utilisation d'un conditionnement non myéloablatif 3) la présence du greffon allogénique pauvre en cellules CD34⁺ et 4) la déplétion de lymphocytes T ⁹¹.

En effet, la fréquence de cette complication après une GMO HLA-identique avec déplétion de lymphocyte T est de 10 % ⁹² avec une augmentation lors des greffes de moelle osseuse non-HLA identiques.

9. Traitement et prévention de la GVHD

Les approches couramment utilisées pour la prévention et le traitement de la GVHD implique le blocage direct de la fonction des cellules T. Ceci inclue la régulation à la baisse ("*down régulation*") des lymphocytes T par inhibition de la prolifération cellulaire (methotrexate), la suppression de la sécrétion d'IL-2 par blocage de l'activité de la calcineurine (cyclosporine, FK-506), l'interférence avec les voies de signalisation de croissance en aval (sirolimus) et la réduction de la réponse des cellules T par blocage du récepteur de l'IL-2 (daclizumab). Cependant, le moyen le plus efficace de la prophylaxie de la GVHD demeure la déplétion des cellules T à partir du greffon ⁹³. Dans plusieurs cas, la déplétion des cellules T peut réduire l'incidence de la GVHD même en l'absence d'une thérapie immunosuppressive post transplantation.

9.1. La déplétion des cellules T (TCD)

Le fait que la GVHD soit causée par les cellules T matures du donneur a mené à plusieurs investigations concernant leur élimination du greffon hématopoïétique. L'utilisation des anticorps monoclonaux fut l'une des premières applications thérapeutiques. Les anticorps dirigés contre les antigènes tels que CD2, CD3, CD5, CD6 et CD7 ainsi que les Ac qui reconnaissent les cellules T et B (CAMPATH-1M), ont été utilisés dans plusieurs expérimentations de déplétion des cellules T du donneur. Cependant, certaines méthodes ont montré que des niveaux aussi faibles que 1% des cellules T pouvaient encore engendrer une GVHD significative.

Ces techniques sont basées sur l'utilisation des anticorps monoclonaux avec lyse par le complément, des immunotoxines ou élimination cellulaire par des billes immunomagnétiques. Il existe aussi des méthodes de séparation physiques (agglutination par la lectine de soja, fractionnement par gradient albumine) permettant d'éliminer les cellules T du donneur.

Une des techniques utilisée pour sa simplicité et son efficacité a été celle utilisant l'Ac monoclonal dirigé contre des tissus lymphoïdes, nommé CAMPATH-1M. Il s'agit d'une IgM de rat dirigée contre CD52, une glycoprotéine de 23 à 30 kd exprimée sur les lymphocytes et les monocytes. Différent de la plupart des autres Ac monoclonaux dirigés contre des cellules humaines, cet anticorps est exceptionnellement capable de lyser les cellules ciblées en utilisant le complément humain ce qui simplifie la manipulation cellulaire. En effet, normalement, les cellules humaines évitent la lyse par le complément homologue via plusieurs et différents inhibiteurs liés à la membrane mais l'Ac anti-CD52 semble capable de surmonter cette restriction parce que l'antigène est exceptionnellement abondant et parce que l'épitope antigénique se trouve très près de la membrane cellulaire.

Cette stratégie présente cependant le désavantage de la non-spécificité, avec élimination de toute les populations T, B et monocyttaire, ce qui est associé à un haut taux de rechute. De façon à préserver l'activité GVL et à prévenir le rejet de greffe, plusieurs

chercheurs ont tenté de cibler des antigènes retrouvés sur des sous-populations de cellules T, à savoir CD6 et CD8⁹⁴⁻⁹⁶ potentiellement responsables de la GVHD.

9.1.1. Avantage de la TCD

Sans une immunosuppression post greffe, le risque d'une GVHD sévère est de plus de 80%, et même avec les meilleurs immunosupresseurs, il existe encore un risque de 40% de GVHD. Les études des années 1980, ont confirmé que la TCD utilisant les Ac monoclonaux en plus du complément de lapin permettait de diminuer de manière uniforme l'incidence d'une GVHD clinique de 10% à 20% après une greffe apparentée. Cette prévention correspond à une déplétion de 2 à 3 log de lymphocytes T^{97,98}.

9.1.2. Limites de la TCD

Comme la TCD protège contre la GVHD et réduit le dysfonctionnement des organes après une GMO, on s'attendrait à ce que ses bénéfices se traduisent par une plus faible mortalité liée à la greffe. Cependant, d'autres études montrent des niveaux de mortalité de 20 à 32 % et ceci même après une greffe apparentée. La majorité des décès sont secondaires aux complications de la greffe, particulièrement aux infections ainsi qu'aux désordres lymphoprolifératifs post transplantation (LPD) associés au virus EBV⁹⁹.

➤ L'accroissement des complications liées aux infections est expliqué par le petit nombre de cellules T CD4⁺ et CD8⁺ se développant à partir des CSH du greffon dans les trois premiers mois de la greffe. Donc l'immunité des cellules T durant cette période est dépendante des cellules T transplantées avec le greffon hématopoïétique⁵⁰.

➤ L'augmentation de l'incidence du rejet de greffe après la TCD reflète probablement la perte de la contribution normale des cellules T à l'éradication des cellules immunitaires résiduelles de l'hôte qui ont survécu au traitement cytologique. L'impact de la TCD sur le rejet de greffe pourrait être réduit par l'intensification du régime de

conditionnement avec une chimiothérapie additionnelle et des globulines antithymocytes¹⁰⁰. Malgré le fait que l'on sait qu'un rejet de greffe après une TCD résulte d'abord d'un rejet immunologique des éléments hématopoïétiques du donneur par les éléments lymphoïdes du receveur qui survivent au conditionnement, le mécanisme physiopathologique du rejet après une GMO avec déplétion de cellules T demeure mal compris. Des évidences directes en faveur d'un rôle du système immunitaire de l'hôte proviennent de l'identification de lymphocytes T de l'hôte au moment du rejet. Ces lymphocytes présentent une activité cytotoxique et sont capables de supprimer la prolifération des GM-CFU et des ECF-U du donneur *in vitro*.

➤ L'augmentation du niveau de rechute leucémique observée accentue l'importance des cellules T dans l'éradication des cellules malignes. Ce rôle immunologique crucial représente un obstacle majeur à l'application de la TCD.

➤ La reconstitution immune retardée :

La plupart des patients qui ont reçu une greffe déplétée en cellules T auront un déficit en cellules T CD4⁺ et un ratio CD4⁺/CD8⁺ inversé pendant les deux premières années¹⁰¹. De plus, le rétablissement fonctionnel des cellules T semble être aussi ralenti après la TCD. Welte et col rapportent que la réponse proliférative des cellules mononucléées du sang à une stimulation par de l'IL-2 exogène reste anormale pendant 6 mois comparée à seulement un mois dans une greffe conventionnelle.

Par ailleurs, les lymphocytes provenant d'un receveur de moelle osseuse dont le greffon a été déplété en cellules T ont un répertoire TCR de variabilité significativement restreinte¹⁰². Ceci peut être expliqué en partie par le fait qu'après la GMO, les compartiments T s'expandent à partir de lymphocytes co-transfusés avec la moelle et par conséquent, les receveurs d'une telle greffe auraient beaucoup moins de précurseurs nécessaires pour reconstituer leur répertoire.

9.2. Les APC et la prévention de la GVHD

D'autres études se sont concentrées sur le rôle des cytokines inflammatoires et des CPA dans la pathogénie de la GVHD. Les régimes intenses de conditionnement avant la transplantation ainsi que les infections subséquentes induisent la sécrétion par les CPA ainsi que par d'autres tissus, de cytokines pro-inflammatoires telles que IL-1 et TNF α . Ces cytokines amplifient les réactions allo-immunes et mènent à une GVHD plus sévère. Dans des modèles de souris, ces réactions peuvent être sensiblement bloquées en employant des antagonistes spécifiques ou des anticorps dirigés contre le récepteur de l'IL-1 ou du TNF. Des tentatives semblables ont été entreprises chez l'humain. En outre, bien que les CPA du donneur puissent interagir et présenter les antigènes de l'hôte, elles semblent le faire moins efficacement que les CPA de l'hôte. Ainsi, l'élimination pré-greffe des CPA du receveur capables de présenter des antigènes de l'hôte par l'intermédiaire des voies endogènes peut réduire l'incidence et la sévérité de la GVHD dans des modèles murins ¹⁰³. Malheureusement, aucune méthode efficace n'existe pour accomplir ceci chez l'Homme.

9.3. Les NK et la GVHD

Il a aussi été démontré que d'autres types de cellules pouvaient prévenir ou supprimer la GVHD et promouvoir un effet GVL. Le transfert de cellules NK-T ou de cellules NK activées du donneur semble capable de supprimer la GVHD ¹⁸. Récemment, Ruggeri *et al* ¹⁰⁴ a démontré que chez des patients atteints de leucémie aiguë, l'alloréactivité des cellules NK du donneur dirigées contre le receveur, pouvait prévenir la rechute leucémique et le rejet de greffe tout en évitant la GVHD. Chez la souris, l'infusion pré-greffe de telles cellules réduit l'incidence de la GVHD. Ces effets semblent médiés par la présence de récepteurs inhibiteurs ¹⁰⁴. En effet, la cytotoxicité des NK fait intervenir deux types de récepteurs, des récepteurs inhibiteurs mais également la présence d'un signal activateur.

9.4. Les lymphocytes T régulateurs

Le rôle des lymphocytes régulateurs dans la maladie du greffon contre l'hôte après une GMO allogénique chez la souris a été récemment étudié. Les lymphocytes régulateurs naturellement présents dans le greffon médullaire retardent spontanément l'apparition de la GVHD. L'administration, au moment de la greffe, d'un grand nombre de lymphocytes régulateurs syngéniques permet de prévenir ou de retarder considérablement la survenue de la GVHD. Cet effet est obtenu aussi bien avec des lymphocytes régulateurs fraîchement purifiés qu'avec des cellules obtenues après leur multiplications *in vitro* ¹⁰⁵.

9.5. La thérapie par gène suicide

Les gènes suicides confèrent aux cellules transduites de nouvelles propriétés métaboliques qui leur permettent de transformer des pro-drogues inactives en composés hautement toxiques. De loin le plus utilisé, le gène de la thymidine kinase du virus Herpes simplex de type 1 (HS-tk) confère aux cellules qui l'expriment une sensibilité à des analogues nucléosidiques comme le ganciclovir. En pratique, cette approche consiste à transfecter *ex vivo* les lymphocytes T du donneur, à les injecter au receveur et, ensuite, en cas de GVHD, à administrer au receveur du ganciclovir pour supprimer les lymphocytes alloréactifs ¹⁰⁶.

En conclusion, pour qu'un régime de déplétion de cellules T soit réussi, il doit faire plus que seulement protéger l'individu contre la GVHD mais aussi préserver l'activité GVL, le potentiel de prise du greffon et épargner les patients d'une toxicité excessive liée à la GMO. Devant l'incapacité des méthodologies actuelles à réguler le problème de la GVHD, nous avons étudié au cours de ce projet de maîtrise une stratégie de déplétion de cellules T utilisant une thérapie photodynamique pour éliminer spécifiquement les lymphocytes T alloréactifs du greffon de CSH.

10. La thérapie photodynamique (PDT)

La thérapie photodynamique (PDT) représente une modalité de traitement encore largement expérimentale et qui est en cours de développement pour l'application à des maladies néoplasiques et non néoplasiques.

10.1. Qu'est ce que la thérapie photodynamique ?

La PDT est une thérapie basée sur l'utilisation de molécules activées par la lumière, appelées agents photosensibilisateurs. Quand ces molécules photosensibles sont activées par la lumière d'une longueur d'onde spécifique, plusieurs formes actives de l'oxygène sont créées, la principale étant le singulet d'oxygène ($^1\text{O}_2$). La formation de singulet dans les membranes cellulaires, le cytoplasme ou encore dans les organelles de la cellule, conduit à des réactions péroxidatives qui peuvent causer des dommages cellulaires et conduire à la mort de la cellule.

Les agents utilisés lors de la PDT ont une propriété d'accumulation sélective dans les cellules anormales ou les cellules hyperprolifératives, comme celles retrouvées dans les tissus cancéreux. Cette accumulation sélective aussi bien que la propriété d'activation par la lumière représentent les bases de la PDT. En effet, l'administration de l'agent photosensible suivie de son activation par la lumière, pourra résulter en une ablation efficace des tissus cibles¹⁰⁷.

10.1.1. Mécanisme de destruction des cellules cibles

L'agent photosensible qui est retenu préférentiellement dans les tissus cibles absorbe la lumière et passe d'un état d'excitation singulet vers un état triplet. Il va ensuite transférer son énergie à l'oxygène moléculaire (à l'état triplet) produisant ainsi des singulet d'oxygène $^1\text{O}_2$ puis va retourner à son état d'activation initiale, et ceci en absorbant un autre photon. Ces processus de transfert d'énergie et de transfert d'électron mènent donc à la formation de radicaux hautement réactifs qui vont médier les effets

primaires de la PDT. Ils interagissent avec des molécules lipidiques et protéiques des tissus cancéreux causant ainsi des dommages et des réponses en aval menant à la mort des cellules malignes ¹⁰⁸.

10.1.2. Les facteurs influençant la réponse des cellules à la PDT

La réponse à ce type de thérapie est dépendante de plusieurs facteurs : l'agent photosensible utilisé, les conditions d'illumination, l'état d'oxygénation du tissu et le type cellulaire impliqué. La localisation cellulaire de l'agent photosensible aura aussi une importance particulière puisqu'elle détermine le lieu des dommages primaires. En effet, une interaction entre l'agent photosensible et la cible est nécessaire pour les réactions de transfert d'énergie ainsi que pour celles de transfert d'électrons. Donc les structures cellulaires ayant une forte concentration en agent photosensible et en oxygène seront préférentiellement endommagées après illumination. Plusieurs facteurs déterminent le modèle de localisation cellulaire de différents agents photosensibles. Les caractéristiques physico-chimiques de ces agents comme la propriété lipophile et la charge, sont très importantes ¹⁰⁹.

10.2. Distribution des agents photosensibles :

Parmi tous les agents photosensibles étudiés, on retrouve une caractéristique commune et prédominante des agents dit «à succès», c'est le ciblage des mitochondries. La plupart des agents photosensibles fluorescent et se localisent *in vivo* au niveau des mitochondries lorsque détectés par microscopie à fluorescence, mais la démonstration *in vivo* de cette distribution spécifique aux mitochondries reste encore intangible. Cette distribution dans les mitochondries pourrait être due à des interactions spécifiques avec des protéines, à des affinités pour des lipides particuliers tels que la cardiolipine ou la phosphatidylsérine qui sont présents en grande quantité dans les membranes internes

des mitochondries, ou encore à la liaison non-spécifique dans les membranes mitochondriales à cause de leurs propriétés hydrophobes .

10.3. Efficacité contre le cancer

Plusieurs agent photosensibles ont été utilisés dans le traitement du cancer, parmi lesquels la Photofrin ¹¹⁰. Cet agent a notamment été approuvé en clinique pour le traitement des cancers du poumon et de l'œsophage. Cependant, l'inconvénient de l'utilisation de la Photofrin est une photosensibilité cutanée prolongée après la PDT.

Une seconde génération d'agent photosensible est donc actuellement en cours de développement pour une application plus large de cette thérapie, aussi bien en oncologie (yeux, ovaires, poumons, cerveau..) que pour les maladies non-oncologiques telles que la formation de plaques athérosclérotiques.

La PDT agit à travers au moins trois principaux mécanismes : l'élimination cellulaire directe par les dommages oxydatifs aux cellules tumorales ; l'élimination cellulaire indirecte due au dommage photodynamique ou l'arrêt de la (neo)vascularisation avec perte d'oxygène et de nutriments pour la tumeur ; et une contribution anti-tumorale additionnelle des réponses immunes et inflammatoires de l'hôte.

Il a été démontré que la thérapie photodynamique extracorporelle avec le 8-methoxypsoralen (8-MOP) pouvait être efficace pour les patients ayant une GVH aigue et chronique après une GMO allogénique. Cette procédure implique l'exposition *in vitro* des cellules mononucléées du sang périphérique obtenues par leukophérèse aux rayons ultra-violetes en présence d'un agent s'intercalant dans l'ADN, le 8-MOP. Le problème majeur de cette thérapie photodynamique est sa toxicité. De plus, l'utilisation des rayons UVA pour activer l'agent photosensibilisateurs augmente les chances d'effets secondaires mutagènes.

11. La thérapie photodynamique avec le TH9402

La dibromorhodamine 123 ou TH9402 est un dérivé de la rhodamine 123 qui a été sélectionné pour ses propriétés photosensibles, sa faible toxicité et sa stabilité. La PDT avec le TH9402 est efficace pour la purge des cellules leucémiques de plusieurs leucémies notamment la LMC ¹¹¹ et les lymphomes non Hodgkinien. Cet agent est hautement efficace, tout en étant spécifique et en préservant les progéniteurs hématopoïétiques. Le TH9402 se localise au niveau des membranes mitochondriales.

11.1. Efficacité du traitement avec le TH9402 dans l'élimination des cellules immunoréactives humaines.

Les similarités structurales entre la rhodamine et le TH9402, nous ont poussé à évaluer la capacité de l'agent photosensibilisateur TH9402 à être retenu par les cellules T activées et à mener à l'élimination sélectives de ces cellules après exposition à la lumière visible (514nm) ¹¹². Des travaux effectués dans notre laboratoire par Guimond *et al*, ¹¹² ont montré qu'il était possible d'éliminer les cellules immunoréactives humaines par thérapie photodynamique avec le TH9402 *in vitro*. Cette voie cytotoxique se base sur la modulation intrinsèque du transporteur Pgp dans les cellules T activées. En effet, ces cellules démontrent une accumulation et une rétention préférentielle du TH9402 par rapport aux cellules non activées. Les cellules non activées qui expriment MDR-1 Multidrug-Resistance ¹¹⁴⁻¹¹⁶, qui est un transporteur capable d'expulser le colorant en dehors de la cellule. Au contraire, le processus d'activation cellulaire bloque MDR-1, ce qui mène à la diminution de l'efflux du TH9402. Cette PDT permet ainsi une élimination importante des populations lymphoïdes CD4⁺ et CD8⁺ exprimant le récepteur à l'IL-2, ce qui va se traduire par une déplétion très efficace des précurseurs cytotoxiques clonogéniques (CTLp) réagissant contre l'hôte. De plus, l'efficacité du traitement permet non seulement d'épargner les cellules non activées mais aussi de préserver leur capacité à générer des réponses prolifératives et cytotoxiques contre des Ags différents du CMH de l'hôte. Dans le cadre d'une transplantation allogénique, l'élimination

sélective de sous-populations de cellules T reconnaissant les Ag d'histocompatibilité de l'hôte représente une stratégie attrayante pour éliminer la GVHD tout en préservant les lymphocytes T capables de générer une réponse immune contre des Ag étrangers.

12. Description du projet de maîtrise

Les travaux dirigés par D.C. Roy ¹¹² ont permis de découvrir un phénomène intéressant pouvant être appliqué au traitement *ex vivo* des greffons de cellules souches hématopoïétiques ou des infusions de lymphocytes du donneur, afin de prévenir la GVHD dans le contexte d'une transplantation allogénique. Ce projet de maîtrise a permis pour sa part d'évaluer l'efficacité de la PDT utilisant le TH9402 à prévenir *in vivo* la maladie du greffon contre l'hôte dans un modèle murin de greffe de moelle osseuse H-2 incompatible et à évaluer la reconstitution immune après une telle approche. En effet, afin de diminuer la mortalité et la morbidité associée à la GVHD, nous avons proposé d'éliminer du greffon les lymphocytes T du donneur qui peuvent réagir spécifiquement contre le receveur en utilisant une thérapie photodynamique. De plus, nous voulions déterminer si un tel traitement du greffon altère la reconstitution immune après la GMO.

12.1. Procédure expérimentale :

La réalisation de ce projet impliquait la mise au point d'un modèle murin de GMO allogénique dans le but d'obtenir une GVHD létale. Deux types de souris ont été utilisées : des souris receveuses C3H/HeJ (C3H) d'haplotype H-2^k qui ont été greffées avec des cellules provenant de souris donneuses C57BL/6J (B6) qui présentent un fond génétique H-2^b. Ce modèle murin démontre donc une incompatibilité majeure au plan du CMH et correspond à une situation excessivement favorable au développement d'une GVHD aiguë et d'un rejet.

- ***La réaction mixte lymphocytaire (MLR) :***

L'activation des cellules T alloréactives est mise en évidence par la réaction mixte lymphocytaire (MLR, mixte lymphocyte reaction) ou culture mixte de lymphocytes (MLC, mixte lymphocyte culture) qui met en présence des cellules T répondeuses et des cellules stimulatrices. Avant la greffe, les cellules spléniques du donneur sont donc co-incubées avec les cellules spléniques du receveur préalablement irradiées (pour empêcher leur prolifération), dans une réaction mixte lymphocytaire en présence d'IL-2. Cette étape permet d'activer *in vitro* les cellules spléniques du donneur qui réagissent contre le receveur, les molécules allogéniques (CMH) induiront donc une forte réponse des cellules T.

- ***La PDT***

Le traitement consiste en une étape de coloration, c'est-à-dire la mise en présence du TH9402 avec les cellules activées par MLR. Cette étape est suivie de l'efflux du colorant de la cellule, ce qui devrait permettre à l'excès de TH9402 de sortir et de distinguer entre les populations de lymphocytes T activées et celle qui ne le sont pas. Un temps d'efflux de 50 min a été retenu pour la PDT. La dernière étape est la photo-activation des cellules par la lumière à 514 nm (lampes) et a été fixée à 5 Joule/cm².

- ***La Greffe :***

Les souris receveuses irradiées furent reconstituées avec un mélange de cellules activées provenant de la MLR (avec ou sans PDT) et de moelle osseuse de souris B6 préalablement déplétée en cellules T, ceci afin de contrôler le développement de la GVHD. Ce greffon a été ensuite injecté dans trois types de receveurs : des souris donneuses B6 (dans notre étude ce groupe est nommé syngénique), des souris receveuses C3H, c'est-à-dire le groupe allogénique, et enfin un troisième type de souris différent des deux précédents, qui représente un tiers receveur ("*third party*").

Cette démarche expérimentale a permis d'étudier l'effet de la thérapie photodynamique sur l'élimination spécifique des cellules alloréactives et sur la

prévention de la GVHD. Ces souris ont été suivies 100 jours post greffe et leurs caractéristiques cellulaires et fonctionnelles ont été examinées avec des techniques immunologiques et ainsi que des techniques de cytométrie en flux en utilisant des Ac monoclonaux spécifiques aux molécules de surface.

12.2. Questions générales orientant le projet

Ce projet a tenté de répondre aux questions suivantes :

- Est-ce que la caractéristique d'incorporation préférentielle du TH9402 dans les cellules T activées humaines se confirme dans un modèle murin ?
- Est ce que l'élimination des lymphocytes du donneur activés contre le receveur permet de prévenir la GVHD dans un modèle de GMO H-2 incompatible et quelle est la spécificité pour l'antigène ciblé?
- Quel est l'effet de la PDT sur la reconstitution immunologique à long terme ?

12.3. Stratégies pour répondre aux questions

Nous avons premièrement déterminé si les phénomènes observés dans l'étude de Guimond *et al*, ¹¹² concernant l'efficacité de la PDT à éliminer les lymphocytes T alloréactifs menait à l'abrogation de la réactivité dans un hôte murin. Pour ceci, il était important d'étudier les cinétiques d'incorporation et d'extrusion du TH9402 dans des cellules T murines activées par MLR. Les résultats de ces travaux démontrent une accumulation et une rétention préférentielle du TH9402 dans les cellules T activées par rapport aux cellules non activées. De plus, les expériences *in vitro* ont montré que la PDT éliminait une proportion significative des cellules T activées par rapport aux populations T non activées, tout en préservant une réactivité contre un tiers receveur.

En effet, ces cinétiques d'incorporation du TH9402 se traduisent en une éradication photodynamique des cellules du donneur immunisées *ex vivo* contre les cellules stimulatrices (du receveur) dans des conditions de stimulation H-2 incompatible.

La deuxième phase de l'étude a démontré l'efficacité du traitement *in vivo* . L'injection de cellules spléniques du donneur B6 activées contre le receveur C3H et de

moelle osseuse de B6 déplétée en cellules T dans le receveur irradié C3H, conduisait à une GVHD létale 20 jours post greffe. Au contraire, les souris qui ont reçu un greffon activé et traité survivaient 100 jours post greffe. De plus, l'administration des cellules activées et traitées a induit une GVH létale dans plusieurs lignées de souris génétiquement différentes des souris B6. Ces résultats confirment la capacité de la PDT à éliminer spécifiquement les cellules activées tout en préservant la plupart des cellules non activées, afin qu'elles puissent exercer une réactivité immune contre des stimuli antigéniques distincts.

La déplétion de lymphocytes T alloréactifs est souvent associée à une déficience immune dans les populations lymphocytaires T. Pour cette raison, la troisième et dernière partie du projet a été consacrée à l'évaluation de la reconstitution immunologique 100 jours post-greffe. Les sites de lymphopoïèse T tels le thymus, la rate et les ganglions ont donc été étudiés. Ces expériences ont permis de démontrer que la reconstitution immune des souris ayant reçu un greffon traité par PDT était semblable à celle des souris du groupe syngénique.

La fonctionnalité des cellules T a été étudiée par la capacité des lymphocytes de souris ayant reçu un greffon allogénique à répondre à une stimulation par un mitogène ou par pontage ("cross-linking") du TCR. Ces expériences ont permis de montrer un rétablissement fonctionnel des cellules T indépendant de la PDT.

Ce projet a donc permis de démontrer l'efficacité du traitement photodynamique à éliminer sélectivement les cellules T alloréactives et à empêcher le développement *in vivo* de la complication la plus grave de la greffe de moelle osseuse allogénique à savoir la GVHD. De plus, il a établi la spécificité antigénique du traitement pour le CMH et la préservation de la fonction immune T post-greffe afin de prévenir les complications infectieuses et la rechute néoplasique.

Deuxième partie

ARTICLE

Résumé

La Maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) et l'altération de la reconstitution sont les premiers obstacles limitant l'efficacité de la greffe de cellules souches allogéneiques (GSC). Le but de cette présente étude est de déterminer si la déplétion sélective des cellules T alloréactives du donneur par thérapie photodynamique (PDT) peut prévenir la GVHD *in vivo* dans un modèle de GSC de souris H-2 incompatible et permettre une reconstitution immunologique efficace.

Les cellules T activées présentent une retention préférentielle de l'agent photosensibilisateur par rapport aux cellules non activées, ce qui résulte en une forte élimination des précurseurs de lymphocytes T cytotoxiques. Les souris receveuses irradiées H-2k (C3H/HeJ and B10BR), sont transplantées avec des cellules de moelle osseuse (déplété en cellules T) de C57BL/6 et des cellules splénique activées contre des cellules des souris C3H/HeJ. Ces souris receveuses vont rapidement succomber à une GVHD aïgue dans les 10 à 47 jours post greffe. Au contraire, les deux souches de souris ayant reçu les cellules T histoincompatible de C57BL/6 et qui ont été précédemment activer contre les cellules de C3H/HeJ et exposer à la PDT, ont survécu plus de 100 jours post transplantation. De plus, un nombre identique de cellules traitées est capable d'induire une GVHD dans plusieurs souches de souris génétiquement différentes.

L'analyse de la reconstitution immune indique que la reconstitution des cellules T et B dans les souris receveuses ayant été greffées avec des cellules activées et traitées, est semblable à celle des souris qui ont reçu un greffon traité autologue. Ceci montre que les cellules immunes sont préservées et sont fonctionnelles. Cette sélectivité de la PDT contre les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité est hautement souhaitable pour la prévention de la GVHD. De plus, la préservation des populations lymphoïdes non activées semble expliquer la rapide reconstitution immune.

Mots clés : Maladie du greffon contre l'hôte (GVHD). Traitement photodynamique (PDT). Greffe de cellules souches hématopoïétique (GSC). Allogreffe. Reconstitution immune. Cellules T alloréactives. Dibromorhodamine methyl ester (TH9402). Culture mixte lymphocyte (MLC). Précurseurs de lymphocytes T cytotoxiques (CTLp)

**SPECIFIC ELIMINATION OF ALLOREACTIVE T
LYMPHOCYTES USING TH9402-BASED PHOTODYNAMIC
CELL THERAPY.**

**Radia Sidi Boumédine*, Gorazd Krosl*, Claude Perreault*, and Denis-Claude
Roy*.**

*Division of Hematology-Immunology, Guy-Bernier Research Center, Hôpital
Maisonneuve-Rosemont; Department of Medicine, Université de Montréal,
Montreal, Canada

DCR is the recipient of a clinician-scientist award of the F.R.S.Q.
Supported by a grant from Celmed BioSciences and the Cancer Research Society of
Canada.

Key words: GVHD, photodynamic treatment, alloreactive T cell, third party and
immune reconstitution.

Correspondence to: Denis Claude Roy, MD
Division of Hematology-Immunology
Guy-Bernier Research Center
Hôpital Maisonneuve-Rosemont
5415 L'Assomption Blvd.
Montreal, QC, H1T 2M4, Canada
Tel.: (514) 252-3404
Fax: (514) 252-3430
E-mail: [REDACTED]

Abstract

Graft-versus-host disease (GVHD) and impaired immune reconstitution are the primary obstacles limiting the efficacy of allogeneic stem cell transplantation (SCT). The purpose of this study was to determine whether selective depletion of donor alloantigen-specific T lymphocytes using photodynamic therapy (PDT) would prevent GVHD and enable immune reconstitution in the context of MHC-mismatched SCT. Activated T cells showed preferential retention of this photosensitizer compared to resting lymphocytes, resulting in higher elimination of cytotoxic T-lymphocyte precursors. When lethally irradiated H-2k mice (C3H/HeJ and B10BR) were transplanted with C57BL/6 derived T cell-depleted bone marrow cells supplemented with C57BL/6 derived spleen cells activated with C3H/HeJ targets, they rapidly succumbed to acute GVHD (within 10-47 days). In contrast, both mouse strains receiving histoincompatible C57BL/6 T cells previously exposed to PDT after activation against C3H/HeJ survived more than 100 days post transplantation. Additionally, the same number of treated cells was able to induce GVHD in several different strains of mice. Analysis of immune recovery indicated that T and B cell reconstitution in MHC-mismatched mice transplanted with treated primed cells was similar to that of mice transplanted with treated or control autologous cells indicating that immune cells were preserved and functional. This selectivity of PDT targeting for major histocompatibility complex antigens is highly desirable for the prevention of GVHD. Moreover, the preservation of resting lymphoid populations could explain the rapid immune reconstitution.

Abbreviations used in this paper: GVH: graft versus host disease, SCT: Bone marrow transplantation, PDT: photodynamic cell therapy, TH9402: dibromorhodamine methyl ester TH9402, MLC: mixte lymphocyte culture, LDA: limiting dilution assays, CTLp: cytotoxic T lymphocyte precursor.

Introduction

Graft-versus-host disease (GVHD) is the most frequent and severe complication to occur after allogeneic stem cell transplantation SCT¹. This condition is mediated by alloreactive T cells present in the stem cell graft that recognize antigenic disparities between donor and recipient cells²⁻⁴. The activation and proliferation of a restricted number of T cells toward one or a few minor or major histocompatibility antigens leads to host tissue damage. While the skin, liver and gastrointestinal tract are primarily affected, damage to the thymic epithelium not only impairs immune reconstitution post-transplant, but most likely contributes to perpetuate anti-host reactivity⁵. The intense anti-host immune response also results in dysregulation of the cytokine environment²⁻⁴, and impairs its own capacity to react rapidly and efficiently to other antigen stimuli. Such T cell defects are usually associated with protracted viral and fungal infections.

Paradoxically, the pharmacologic control of GVHD, usually with immunosuppressive agents, enhances the response to anti-viral and anti-fungal medication, underlining the particularly deleterious effect of continued and focussed immune stimulation⁶. Nevertheless, even when GVHD is controlled, patients treated with immunosuppressive drugs remain immunodeficient and at higher risk for opportunistic infections⁷. Selective removal of T cells with reactivity toward host antigens represents an appealing alternative to pharmacological immune suppression. In previous studies, we have also shown that 4,5 dibromorhodamine methyl ester (TH9402), a rhodamine derivative, possesses photosensitive properties that could be used for the specific elimination of alloreactive T cells⁸. The preservation of resting T cells for which we have demonstrated sustained in vitro reactivity toward foreign antigens suggests that these T cells could play a determining role in the control of infections and disease relapse. In addition, similar cell processing conditions using higher concentrations of TH9402 could abrogate GVHD in vivo and permit cells to respond to a lymphoma cell line⁹. Nevertheless, the capacity of TH9402 treatment to allow B and T cell reconstitution has not been evaluated.

In the present study, we demonstrated the selectivity of PDT for *ex vivo* activated cells by showing elimination of GVHD in mouse strains with the same antigenic MHC disparity, but preservation of alloimmune reactivity in third party animals. While T cells in PDT+ surviving animals failed to demonstrate an activated T cell phenotype, as would be expected in animals with sub-clinical GVHD, they were capable of homeostatic expansion. In addition, quantitatively and qualitatively preserved B and T cell populations should help fight the viral and fungal infections that represent the principal cause for failure of haplo-identical transplants.

Materials and methods

Mice. The following strains of mice were purchased from The Jackson Laboratory: C57BL/6J (B6) (H-2^b), C3H/HeJ (C3H) (H-2^k), B10BR (H-2^k), BALB/cJ (H-2^d), SJL/J (H-2^s), SM/J (H-2^v), DBA/1 (H-2^q). Mice were bred and housed in specific pathogen-free conditions at the Guy-Bernier Research Centre according to the standards set by the Canadian Committee for Animal Protection. All mice were used between 6-10 weeks of age.

Immunophenotypic analysis. Expression of cell surface B and T cell antigens was evaluated by direct immunofluorescence using standard techniques.(REF) The following monoclonal antibodies (mAbs) and their isotypic controls were obtained from Pharmingen: PerCP-conjugated anti-CD8a (53-6.7; rat Ig G2a, κ), anti-CD4 (RM4-5, rat IgG2a, κ); FITC-conjugated anti-Thy1.2 (30-H12; rat Ig G2b), anti-H-2K^d (SF1-1.1, mouse IgG2a, κ), anti-H-2K^b (AF6-88.5, mouse IgG2a, κ), anti-H-2K^k (36-7-5, mouse IgG2a, κ); APC-conjugated anti-CD44 (Pgp-1; IM7, rat Ig G2b, κ), anti-CD8a (53-6.7; rat Ig G2a, κ), anti-CD4 (RM4-5, rat IgG2a, κ) ; PE-conjugated anti-CD44 (Pgp-1; IM7, rat Ig G2b, κ), anti-CD62L (Mel-14; rat IgG2a, κ), and anti-CD69 (H1.2F3; hamster IgG). Labelling with appropriate fluorochrome-conjugated isotype-matched controls assessed non-specific binding of mAbs. Immunofluorescence reactivity was determined by automated multi-parameter flow cytometry analyzing at least 10^4 cells in each sample (FACSCalibur; Becton Dickinson, Mountain View, CA) and processed using Cell Quest software (Becton Dickinson).

In vitro cell activation. For bulk cultures, Con A blasts and limiting dilution assays, cells were suspended in RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY) supplemented with 10% FBS (fetal bovine serum, HyClone Laboratories, Logan, UT), 100U/ml penicillin G, 100 μ g/ml streptomycin, 2 mmol L-glutamine (all from Gibco, Grand Island, NY) and 5 μ M 2-Mercaptoethanol (Sigma Chemical Co., St Louis, MO). T lymphocytes were activated in a one-way mixed leukocyte culture (MLC)¹⁰. Spleen cells from several donor C57BL/6J (H-2^b) mice were pooled into single-cell suspension, incubated at 37°C in 5% CO₂ in a humidified atmosphere in the presence

of 50 U/ml interleukin-2 (rhIL-2, R&D systems, Minneapolis, MN) for 4 days with an equal number of irradiated (25Gy from a ^{137}Cs source Gamma cell, Atomic Energy of Canada, Ottawa, ON) C3H/HeJ (H-2^k) stimulator cells). For Con A blasts, the suspension of spleen cells was cultured in flasks for 72 h at a concentration of 2.5×10^6 cells /ml (n-Nucleon, Nunc, Denmark) with 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of concanavalin A (Sigma).

Photodynamic treatment. After *in vitro* activation, the cells were harvested, washed and resuspended at a density of 1×10^6 cells/ml in X-vivo medium (Bio-Whittaker, Walkersville, MD) supplemented with 2.5% FBS. The cells were then allowed to internalize 10 μM TH9402 (Celmed BioSciences, Montreal, Canada) for 40 minutes. After a wash with X-vivo medium supplemented with 10% FBS, the photosensitizer was cleared from cells for up to 90 minutes. During the uptake and clearance periods, aliquots were taken at 10-minute intervals to evaluate the intracellular concentration of the dye by flow cytometric analysis. At the end of the efflux period, samples were submitted to 5 J/cm^2 of light energy at a wavelength 514 nm (PDT-Xerox Series 4, Celmed BioSciences).

Limiting Dilution assays. Limiting dilution analysis (LDA) was used to determine the frequencies of responding cytotoxic (CTLp) and proliferative (HTLp) T lymphocyte precursor cells in treated and untreated conditions using previously described methods ¹¹⁻¹³. Briefly, to determine CTLp and HTLp frequency, spleen cells from donor primed against recipient, treated and untreated spleen cells (3×10^6 to 450 cells/well) were seeded in 96-well microtiter plates in the presence of 1×10^5 -irradiated stimulator spleen cells (C3H/HeJ or BALB/cJ) and cultured for nine days in medium supplemented with 50U/ml rIL-2. As a control, irradiated stimulator cells were cultured without responders. On day 5, half the medium from each well was replaced with fresh medium with rIL-2. After 9 days of culture, each well was tested for cytolytic activity against 5×10^3 initial stimulator and third party cells using a standard ^{51}Cr -release assay. Supernatants were harvested from assay wells and counted in a gamma counter. Spontaneous release was less than 15%. Results for individual wells were expressed as percentage of specific lysis calculated as follows:

$$\% \text{ specific lysis} = 100 \times (\text{experimental release} - \text{spontaneous release}) / (\text{maximum}$$

release [% Triton X-100] - spontaneous release). Wells were scored as positive if their ^{51}Cr release exceeded the spontaneous release by more than two standard deviations (SD). The frequency of responding cells CTLp and HTLp within the test population was estimated by use of chi-square minimization ¹¹⁻¹³.

Stem Cell Transplantation. Bone marrow cells were harvested from tibias and femurs of donor mice, T cell depleted and transplanted as described ¹⁴. Briefly, cells were suspended at a concentration of 1×10^7 cells /ml in RPMI 1640 supplemented with 5% FBS, 100U/ml penicillin G, and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin, and incubated with rabbit anti-mouse T cells (Thy1) antiserum (Cedarlane Labs, Hornby, Ontario, Canada) at 4°C for 1 hour. The cells were then pelleted by centrifugation, resuspended in rabbit serum (Low-Tox-M rabbit complement; Cedarlane Labs.) as a source of complement, and incubated at 37°C for 1 hour. Cell suspensions were analysed for efficacy of depletion by flow cytometry using an anti-Thy1.2 Ab, and adjusted for injection. Recipient mice received 1000 cGy total body irradiation from a ^{60}Co source at a dose rate of 128 cGy/minute on the day of transplant. Bone marrow and spleen cells were given as a single intravenous injection, via the tail vein.

Induction of GVHD. GVHD was induced by intravenous injection of a suspension of C57BL/6 (H-2^b) T cells activated against C3H/HeJ (H-2^k) cells into irradiated recipients. Recipients, C3H/HeJ (H-2^k; principal party) or BALB/c (H-2^d; third party), received either activated treated T cells (treated graft) or activated untreated T cells (untreated graft). Syngenic groups (B6 → B6 transplantation) that received treated or untreated T cell graft served as controls.

Lymphocyte stimulation assays. T cells isolated from mice that survived up to 100 days post transplantation were cultured for 2 days in the presence of either anti-CD3 mAb or concanavalin A. Proliferative response was determined by measuring [^3H] thymidine incorporation following 18h of incubation ¹⁵.

Statistical analysis. Survival curves were constructed using the Kaplan-Meier product limit and were compared using the log rank test. Analyses were considered significant when reaching the 0.05 alpha level.

Results

Preferential accumulation of TH9402 in activated T cells

To determine whether the specificity of photodynamic cell therapy reflects the capacity of activated T cells to preferentially accumulate and retain the TH9402 photosensitizer, the kinetics of TH9402 uptake and retention were first evaluated in activated and non-activated CD4⁺ and CD8⁺ cells. After exposure to allogeneic cells in a MLC, activated T cells (CD4⁺CD44^{hi}) and (CD8⁺CD44^{hi}) incorporated more TH9402 than resting T cells (CD4⁺CD44^{lo} and CD8⁺CD44^{lo}) (Figure. 1). CD44^{int} incorporated and extruded TH9402 similarly to During CD44^{lo} T cells These results show that TH9402 influx kinetic differ between different T cell populations and correlate with their activation status.

Specific elimination of activated T cells after photodynamic treatment

Assuming that TH9402-mediated cytotoxicity correlates with accumulation levels, the difference in TH9402 retention between activated and resting T lymphocytes should translate into increased sensitivity of activated cells to PDT. Since dye accumulation levels stabilized after 50 minutes, we decided to treat T cells at this time-point in all subsequent experiments. T cells survival in treated and in untreated samples was evaluated 3 days after PDT using flow cytometry. PDT eliminated a higher proportion of CD44^{hi} T lymphocytes in comparison to untreated cells and resulted in an increased proportion of cells demonstrating low levels of CD44 expression (Figure 2A). This translated in the elimination of approximately one log of both activated (CD44^{hi}) CD4⁺ and CD8⁺ T cells, with a marginal effect on resting T cells (CD44^{lo}) (Figure 2B). These data along with TH9402 influx/efflux profiles indicate that the specificity of photodynamic cell therapy relies on the capacity of activated T cells to preferentially accumulate and retain the TH9402 photosensitizer.

Depletion of alloreactive cytotoxic and helper T lymphocyte precursors.

Activation levels could vary within T cell populations according to their capacity to recognize and respond to the immunizing antigen. Thus, experiments were designed to evaluate the effect of treatment on both alloreactive cytotoxic (CTLp) and helper (HTLp) T lymphocyte precursors. Spleen cells of B6 donors activated *in vitro* in a one-way MLC against irradiated C3H cells (principal party) underwent PDT. Treated and untreated cells were then presented with either principal (C3H origin) or third party (BALB/c) splenocytes, and cytotoxic and proliferative responses measured. The number of cytotoxic precursors against principal party was decreased by approximately 2 logarithms (logs) (Figure. 2D). Although the alloreactive response against BALB/c (third party) was not completely conserved, its attenuation was significantly less dramatic than that of anti-C3H cells. The depletion of alloreactive HTLp reached approximately one log, and while there was an effect on third party reactivity, it was also of lower magnitude than with principal party. These data show that PDT eliminates large numbers of antigen specific CTLp, while preserving significant amounts of their resting counterparts. They also identify greater cytotoxicity toward CTLp than HTLp.

PDT of activated T cells prevents acute GVHD after allogeneic transplantation

We then determined the impact of photodynamic elimination of donor cells with anti-host reactivity on the development of GVHD *in vivo*. After activation against C3H cells, primed B6 T cells were PDT treated or not, and administered along with a T cell depleted marrow graft to various mouse strains. When untreated B6 T cells were given to C3H recipients, all mice developed acute GVHD and died rapidly (within 20 days) (Figure 3A). In contrast, when these same T cells underwent TH9402 PDT, their survival was greatly improved, with 78% of animals surviving the transplant. These animals recovered weight rapidly but it decreased slightly after 40 days. Nevertheless, these animals failed to demonstrate other clinical signs of GVHD (skin, hair, gait, etc.).

B10BR recipients, which differ from B6 (H-2^b) by the same H-2^k phenotype as C3H, were then used to verify the specificity of PDT for T cells capable of recognizing the MHC antigenic disparity (Figure 3CD). Although donor cells were activated against C3H rather than host B10BR cells, PDT resulted in the survival of 100% of animals.

In addition, these animals had normal weight gain, and no clinical sign of GVHD (data not shown). In contrast, all animals transplanted with untreated T cells all died. These results clearly demonstrate the capacity of TH9402 treatment to prevent the development of GVHD in an antigen-dependent fashion.

Specific elimination of alloreactive cells

The specificity of PDT for anti-host stimulated cells was evaluated by injecting treated and untreated cells into lethally irradiated third party BALB/c (H-2^d) mice (Figure 4A). Untreated B6 cells, primed against C3H, induced severe GVHD in BALB/c animals, all mice dying within 15 days after transplantation. Interestingly, the administration of treated cells also induced lethal GVHD, but with a median delay of approximately 70 days. Similar results were obtained with other third party animals: SJL/J (H-2^s), SM/J (H-2^v) and DBA/1 (H-2^q) (data not shown). In addition, the infusion of one-tenth the number of untreated primed T cells, a number below that predicted from all previous experiments, also caused a small delay in mortality (Figure 4B). These results demonstrate that PDT in conditions eliminating anti-host cells and preventing the development of GVHD also preserves anti-third party reactivity. However, a slight PDT-induced delay in the occurrence of GVHD is observed in the latter group and could be attributable to a decrease in the number of T cells infused and maybe a transient immunosuppressive effect.

To ensure that the favourable impact of PDT on the prevention of GVHD did not reflect non-specific elimination of T cells, de-escalating numbers of anti-C3H primed B6 T cells were infused into C3H hosts (Figure 4C). While PDT demonstrated less than 0.3 logs of non-specific elimination of T cells, the depletion of 1.5 logs of T cells had no impact on mortality curves, and even the infusion of 2 logs less T cells (0.04×10^6 splenocytes) did not generate the survival levels reached with PDT. Thus, PDT may alter T cell function, in addition to eradicating alloreactive T cells.

T and B cell reconstitution after transplantation

PDT efficiently prevented GVHD by physically, and maybe functionally, depleting alloreactive T cell clones from the hematopoietic stem cell graft. Such manipulations could impair the capacity of the host to satisfactorily reconstitute its T and even B cell compartments^{5,16-18}. To evaluate these possibilities, T and B cell reconstitution was evaluated on day 100 in non-transplanted B6 mice, B6 receiving B6 T cells

primed against C3H but non-treated, and B6 and C3H mice receiving B6 primed T cell grafts exposed to PDT. Haplotype analysis of allogeneic transplants showed that all cells recovered from the spleen and thymus were of donor (H-2^b) origin (Figure 5A).

Splenic cellularity in mice transplanted with treated allogeneic grafts was comparable to that of syngeneic transplants receiving primed and treated T cells, as well as normal mice (Figure 5B). However, mice that received non-treated allogeneic grafts, and consequently developed GVHD, had significantly lower numbers of splenocytes. Additionally, there was no significant difference between the groups in terms of CD4⁺ and CD8⁺ cell numbers (Figure 5C), as well as in B cell content of the spleen (Figure 5D). While mice that received treated allografts had lower thymus cell content, this difference was only significant when compared to non-transplanted mice. Exposure to TH9402 also had no effect by itself (Figure 5E). In addition, the proportions of CD4, CD8 and double positive thymocytes were comparable to other groups and normal mice (Figure 5F). These findings indicate PDT did not affect lymphoid cell populations in the spleens and thymi, the small differences observed being rather attributable to the transplant procedure itself.

Post-transplantation T cell activation status

To define the effect of PDT on T cell activation in transplanted mice, we analysed graft derived T cell populations for the expression of CD44, CD62L and CD69 antigens, which expression profiles differentiate between activated/memory and naïve T cells. Representative profiles of expression of these antigens are shown for CD4⁺ and CD8⁺ populations (Figure 6A). While the expression of CD69 was similar in all groups of mice, the expression of CD44 and CD62L was affected when mice receiving treated T cell graft were compared to normal mice, but no difference was found with primed and treated T cells given to syngeneic hosts (Figure 6B). Both C3H and B6 mice that received treated T cells had higher proportions of CD44^{hi} and lower proportions of CD62L^{hi} expressing CD4⁺ and CD8⁺ populations than B6 receiving untreated primed T cells and control mice (Figure 6B). Thus, treated grafts had slightly higher proportions of activated T cells, but total numbers of activated cells were only increased in the syngeneic transplants that were administered a

primed T cell graft exposed to PDT. These findings suggest that PDT itself may exert an activating effect on some populations of T lymphocytes.

Proliferative capacity of T cells

In order to determine whether TH9402 had an impact on immune cell reactivity, splenocytes were harvested 100 days post transplant. Response to anti-CD3 mAb or concanavalin A (ConA) was evaluated after 24- and 48-hour cultures by measuring [^3H] thymidine incorporation. Proliferative responses were evaluated in the same group of animals as described in the previous section (Figure 7). Whether cells were incubated for 24 or 48 hours, exposure to anti-CD3 and ConA with or without IL-2 resulted in similar 3H-thymidine incorporation levels for all groups of animals. These results confirm the capacity of treated T cells to rapidly recover adequate function to respond to antigenic stimulation.

Discussion

Allogeneic SCT is the treatment of choice for numerous haematological disorders. However, the principal limitation to the wide application of allogeneic SCT is the requirement for donor–recipient HLA compatibility in order to avoid GVHD. Various strategies for the prevention of this complication have been proposed (⁷), but treatment of GVHD still remains unsatisfactory. Indeed, removal of donor-derived T lymphocytes prior to transplantation efficiently decreases the incidence and severity of GVHD. However, it is frequently associated with increased risk of viral opportunistic infections, engraftment failure and leukemia relapse ^{19,20}. An ideal approach would thus aim at selective elimination of alloreactive T cells, and preservation of T lymphocytes with other specificities.

PDT using TH9402 as a photosensitizer has been already been demonstrated as an efficient modality for the elimination of neoplastic cells in chronic myelogenous leukaemia. Based on these result, we have then shown that PDT using TH9402 is highly toxic for activated human T cells *in vitro*, and spares resting T cells ⁸. Thus, we were interested in determining whether this favourable treatment profile observed *in vitro* would translate into the prevention of GVHD *in vivo*.

In the present study, we first demonstrated that PDT using the same concentration (10 μ M) of TH9402 found effective for selection depletion of human alloreactive T cells specifically eliminated activated murine T cells, while sparing resting lymphocytes *in vitro* (Figure. 2). While the effectiveness of PDT with TH9402 depends on the amount of singlet oxygen and free radical generation by photoactivated drug, the increased sensitivity of activated T lymphocytes to PDT most likely results from their greater uptake/retention of the photosensitizer than resting T cells. This could be due to metabolic changes in the mitochondria, increasing their number and affinity for the dye, since TH9402 is a compound already known to localize to the mitochondria ^{21,22}. Importantly, the increased *in vitro* sensitivity of activated T cells to PDT translated into a decreased incidence of GVHD when PDT treated T cells were transplanted into allogeneic mice.

When B6 T cells (H-2^b) primed against C3H (H-2^k) and exposed to PDT were transplanted into B10BR (H-2^k) mice, all mice survived while their no-PDT counterparts demonstrated 100% lethality at 40 days. In contrast, the same T cell graft, whether treated or not, did not prevent the development of GVHD and lead to 100% mortality of Balb/c or other third party mice. These results confirm the efficacy of ex vivo priming for stimulation of alloreactive T cells. In addition, they show the high level of specificity of PDT in the elimination of anti-H-2^k and sparing of other T cells to react against other MHC antigens.

While all third party recipients died after administration of primed T cells, we noted a slight delay in the development of GVHD. Such a delay could be explained by the small decrease in T cells associated with the PDT. However, we cannot exclude a functional immunosuppressive effect of PDT on resting T cells. In the context of antigenic mismatches between donors and recipients involving the complete MHC disparities, one would expect a high number of donor alloreactive T cells with potential to react towards host cells. The photodynamic eradication of high numbers of alloreactive T cells most likely results in the release of cellular debris and toxic metabolites that could affect neighbouring cells. Since TH9402-mediated PDT induces elimination of activated T cells via the apoptotic pathway (data not shown), the clearance of apoptotic cells by stimulated macrophage could result in the enhanced secretion of IL-10, with subsequent suppression of T cell activity^{23,24}. Therefore, until activated T cells are killed by PDT, they could exert an inhibitory effect on resting T cells by secretion of inhibitory cytokines^{25,26}. It is also possible that cytokines released during the MLC would induce a low level of activation in non-alloreactive T cells rendering them susceptible to the PDT. Nevertheless, this potential immunosuppressive effect is weak and limited over time.

The surviving mice transplanted with treated allogeneic graft presented a weight reduction compared to the mice that received syngeneic treated grafts (Figure 3B). It is known that chronic GVHD results in immune deficiency, which is characterised by lymphoid atrophy, and inadequate responses to both recall antigen and new epitope²⁷⁻²⁹. However, these mice did not develop clinical signs of chronic GVHD, no splenic atrophy was observed, and the immunophenotypic analysis of lymphoid

populations in the thymus, including double positive cells, and spleen failed to show a difference with other treated or non-treated controls. Future studies will be done to evaluate the possibility of sub-clinical chronic GVHD. If subtle changes compatible with GVHD were to be identified, these changes could be attributable to differences in Mls superantigens. Indeed, such disparity in Mls antigens was absent in the context of B6 grafts injected to B10BR mice, and not only did PDT in these mice lead to normal weight recovery, but all mice survived the transplant.

Flow cytometric analysis (Figure.2) demonstrated that PDT eliminated only one log of activated T cells. In addition, PDT resulted in 2 logs of depletion of host-reactive CTLp, but only one log of HTLp. The elimination of such low numbers of total T cells in comparison to the 3 logs of T cell depletion usually required to abrogate GVHD brings to light the potential of selective eradication of alloreactive T cells to improve patient prognosis. This impressive *in vivo* effect also emphasizes the potential role of resting T cells in occupying immunologic niches and preventing the expansion of alloreactive T cells.

In terms of immunologic reconstitution, flow cytometric analysis of recipient cells isolated from spleen and thymus was performed 100 days after transplantation. The thymus, spleen (Figure.5, 6) and lymph nodes (data not shown) from mice transplanted with a treated allogeneic graft, displayed a normal cellularity and normal CD4⁺/CD8⁺ ratios. Their spleen cells were able to proliferate in response to concanavalin A or anti-CD3 (Figure 7). The expression of T cell markers associated with functional activation showed an increase in proportion of activated / memory T CD4⁺ and CD8⁺ cells in both the allogeneic and syngeneic recipients of treated graft (Figure 6). These cells are characterized by the increased expression of CD44 and down regulation of CD62L^{26,26,30,31}. It is interesting to note that increased number of CD44^{hi}/CD62L^{lo} cells was observed only in mice transplanted with treated grafts. Thus, this could be the result of homeostasis driven proliferation of T cells after SCT in response to the slight lymphopenia.

In conclusion, we have designed a photodynamic strategy that allows efficient and specific depletion of activated T cell from the allogeneic graft. The results indicate that using this strategy one could attenuate GVHD after allogeneic SCT and induce

satisfactory T- and B cell reconstitution. These results should lead to the development of clinical studies to evaluate this GVHD prevention strategy for allogeneic SCT in humans.

Figure legends

Figure 1. Kinetics of incorporation of TH 9402 in resting and activated T lymphocytes. Donors (C57BL/6) cells were first primed against host (C3H/HeJ) cells in a one-way, 4-day MLC and then T cells were incubated with 10 μ M TH9402 for 40 minutes, washed and a dye efflux was observed. TH9402 dye retention was analysed in CD4⁺ (A) or CD8⁺ (B) T cells and for CD44 expression using flow cytometry analysis. TH9402 fluorescence is expressed as mean fluorescence intensity (MFI) in three-gated population; activated T cells CD44 hi (diamonds \diamond), intermediate T cells CD44 int (square \square) and in naive T cells CD44 lo (square \square). Activated T cells incorporate much more TH9402 than resting T cells. Each data point refers to three separate experiments.

Figure 2. TH9402 PDT eliminates activated CD4⁺ and CD8⁺ cells and preserves anti-third party CTLp. MLC-activated cells underwent TH9402 PDT and after 72 hours, T-cells populations CD4⁺ and CD8⁺ were assessed for CD44 expression using flow cytometry (A, B, C). After treatment, cells were also cocultured with irradiated stimulators cells from the same host or third party cells for 5 days and cytotoxicity was measured against corresponding targets was tested in a standard 4-hour chromium release assay. Panel D shows effect of TH9402 treatment of MLR-activated cells (B6 x C3H*) on the frequency of CTLp cells directed against stimulator C3H/HeJ * and third party (BALB/c*) cells. Panel E shows the effect of PDT on HTLp. Results are expressed as mean \pm SEM of 3 experiments.

Figure 3. Photodynamic cell treatment reduced incidence of GVHD in same-party mice model and this depletion is directed against primed H-2^k haplotype. Spleen cells from C57BL/6 mice were first primed with irradiated (25Gy) C3H/HeJ spleen cells in a 4-day MLC. The primed cells were then treated with photodynamic cell purging process. After treatment, four million T cells were infused into lethally irradiated C3H/HeJ (same-party, 1000 cGy) mice together with 1×10^7 T cell-depleted bone marrow cells from C57BL/6 mice. Each groups contained 20 animals. Panels A and B represent survival and body weight of same-party C3H/HeJ (H-2^k) recipients,

respectively; Panels C and D represent survival and body weight of B10BR (H-2^k) recipients, respectively.

Figure 4. Effect of PDT on anti-third-party GVHD. After treatment, four million cells were also infused into lethally (1000cGy) irradiated BALB/c (third-party) mice together with 1×10^7 T cell-depleted bone marrow cells from C57BL/6 mice. Each groups contained 4-10 animals. Panel B represents survival following transplantation with T-cell depleted bone marrow from C57BL/6 mice, and de-escalating doses of T cells following activation (without PDT) into MHC-incompatible recipient Balb/c mice. Panel C shows survival curves of C3H/HeJ recipients after transplant with T-cell depleted bone marrow from C57BL/6 mice and the administration of de-escalating numbers of T cells.

Figure 5. Effect of PDT on T and B cell populations. Animals which received allogeneic activated treated cells and syngeneic MLC-activated cells were sacrificed on days 100 post transplant and proportions of cells were calculated from total cell counts and multicolour flow cytometric analyses. Non-transplanted or syngeneic treated and untreated mice served as controls. (A) Donor or host origin was determined with anti-H-2^b, which only reacts with leukocytes of host origin. Absolute lymphocyte counts were measured in spleen (B, C, D) and thymus (E, F). The surface expression of CD4 and CD8 on T cells (C) and the percentage of B cells (D) were determined in spleen. Panel E and F represent thymic cellularity and proportion of double- and single-positive thymocytes, respectively. Results are expressed as mean \pm SEM of 3-5 mice per group.

Figure 6. Differential expression of CD44, CD62L and CD69 in surviving mice 100 days post transplantation. All recipients were sacrificed on day 100 and spleens were harvested and processed for flow cytometric analysis. Normal (untransplanted) B6, allogeneic and treated C3H/HeJ, syngeneic treated and untreated splenocytes stained with CD4 or CD8, CD44, CD62L and CD69. In (A) representative flow cytometry histograms relative to activation marker profiles on gated CD4 and CD8 cells from different groups of recipients are shown. In panel (B), the percentage

(mean \pm SEM) of CD44, CD62L and CD69 T cells population are representative of at least three independent experiments.

Figure 7. PDT has no deleterious effect on the T cell proliferative response after SCT. All C3H/HeJ and C57BL/6 recipients, in groups as described in figure 5, were sacrificed on day 100 and splenocytes obtained to assay for proliferation in response to anti-CD3 (A, B) and Con A alone (C, D) or in the presence of IL-2 (E, F). Splenocytes were cultured for 24 hours (A, C, E) or 48 hours (B, D, F) with Con A or anti-CD3, and [3 H]-thymidine was added during the final 18 hours of culture. Values represent mean \pm SE.

References:

Reference List

- (1) Ferrara JL, Deeg HJ. Graft-versus-host disease. *N Engl J Med.* 1991;324:667-674.
- (2) Antin JH, Ferrara JL. Cytokine dysregulation and acute graft-versus-host disease. *Blood.* 1992;80:2964-2968.
- (3) Ferrara JL, Cooke KR, Pan L, Krenger W. The immunopathophysiology of acute graft-versus-host-disease. *Stem Cells.* 1996;14:473-489.
- (4) Theobald M. Allorecognition and graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant.* 1995;15:489-498.
- (5) Roux E, Dumont-Girard F, Starobinski M et al. Recovery of immune reactivity after T-cell-depleted bone marrow transplantation depends on thymic activity. *Blood.* 2000;96:2299-2303.
- (6) Ho VT, Soiffer RJ. The history and future of T-cell depletion as graft-versus-host disease prophylaxis for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2001;98:3192-3204.
- (7) Blazar BR, Korngold R, Vallera DA. Recent advances in graft-versus-host disease (GVHD) prevention. *Immunol Rev.* 1997;157:79-109.
- (8) Guimond M, Balassy A, Barrette M et al. P-glycoprotein targeting: a unique strategy to selectively eliminate immunoreactive T cells. *Blood.* 2002;100:375-382.

- (9) Chen BJ, Cui X, Liu C, Chao NJ. Prevention of graft-versus-host disease while preserving graft-versus-leukemia effect after selective depletion of host-reactive T cells by photodynamic cell purging process. *Blood*. 2002;99:3083-3088.
- (10) Brochu S, Baron C, Hetu F, Roy DC, Perreault C. Oligoclonal expansion of CTLs directed against a restricted number of dominant minor histocompatibility antigens in hemopoietic chimeras. *J Immunol*. 1995;155:5104-5114.
- (11) Fontaine P, Langlais J, Perreault C. Evaluation of in vitro cytotoxic T lymphocyte assays as a predictive test for the occurrence of graft vs host disease. *Immunogenetics*. 1991;34:222-226.
- (12) Roy DC, Ouellet S, Le Houillier C et al. Elimination of neuroblastoma and small-cell lung cancer cells with an anti-neural cell adhesion molecule immunotoxin. *J Natl Cancer Inst*. 1996;88:1136-1145.
- (13) Taswell C. A solution to the problems of cytotoxicity assays with additional applications to other immunological and biochemical assays. *J Immunol*. 1987;138:333-341.
- (14) Dulude G, Brochu S, Fontaine P et al. Thymic and extrathymic differentiation and expansion of T lymphocytes following bone marrow transplantation in irradiated recipients. *Exp Hematol*. 1997;25:992-1004.
- (15) Alpdogan O, Schmaltz C, Muriglan SJ et al. Administration of interleukin-7 after allogeneic bone marrow transplantation improves immune reconstitution without aggravating graft-versus-host disease. *Blood*. 2001;98:2256-2265.
- (16) Baker MB, Altman NH, Podack ER, Levy RB. The role of cell-mediated cytotoxicity in acute GVHD after MHC-matched allogeneic bone marrow transplantation in mice. *J Exp Med*. 1996;183:2645-2656.
- (17) Verma UN, Mazumder A. Immune reconstitution following bone marrow transplantation. *Cancer Immunol Immunother*. 1993;37:351-360.
- (18) Witherspoon RP, Lum LG, Storb R. Immunologic reconstitution after human marrow grafting. *Semin Hematol*. 1984;21:2-10.
- (19) Aversa F, Tabilio A, Velardi A et al. Treatment of high-risk acute leukemia with T-cell-depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype. *N Engl J Med*. 1998;339:1186-1193.
- (20) Appelbaum FR. Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy. *Nature*. 2001;411:385-389.
- (21) Villeneuve L. Ex vivo photodynamic purging in chronic myelogenous leukaemia and other neoplasias with rhodamine derivatives. *Biotechnol Appl Biochem*. 1999;30 (Pt 1):1-17.

- (22) Ferlini C, Biselli R, Nisini R, Fattorossi A. Rhodamine 123: a useful probe for monitoring T cell activation. *Cytometry*. 1995;21:284-293.
- (23) Fadok VA, Bratton DL, Konowal A et al. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest*. 1998;101:890-898.
- (24) Voll RE, Herrmann M, Roth EA et al. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature*. 1997;390:350-351.
- (25) Cohen JL, Boyer O, Klatzmann D. Suicide gene therapy of graft-versus-host disease: immune reconstitution with transplanted mature T cells. *Blood*. 2001;98:2071-2076.
- (26) Sprent J, Tough DF. Lymphocyte life-span and memory. *Science*. 1994;265:1395-1400.
- (27) Baker MB, Riley RL, Podack ER, Levy RB. Graft-versus-host-disease-associated lymphoid hypoplasia and B cell dysfunction is dependent upon donor T cell-mediated Fas-ligand function, but not perforin function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:1366-1371.
- (28) Siadak M, Sullivan KM. The management of chronic graft-versus-host disease. *Blood Rev*. 1994;8:154-160.
- (29) Atkinson K. Chronic graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant*. 1990;5:69-82.
- (30) Sprent J, Tough DF. T cell death and memory. *Science*. 2001;293:245-248.
- (31) Tough DF, Sprent J. Turnover of naive- and memory-phenotype T cells. *J Exp Med*. 1994;179:1127-1135.

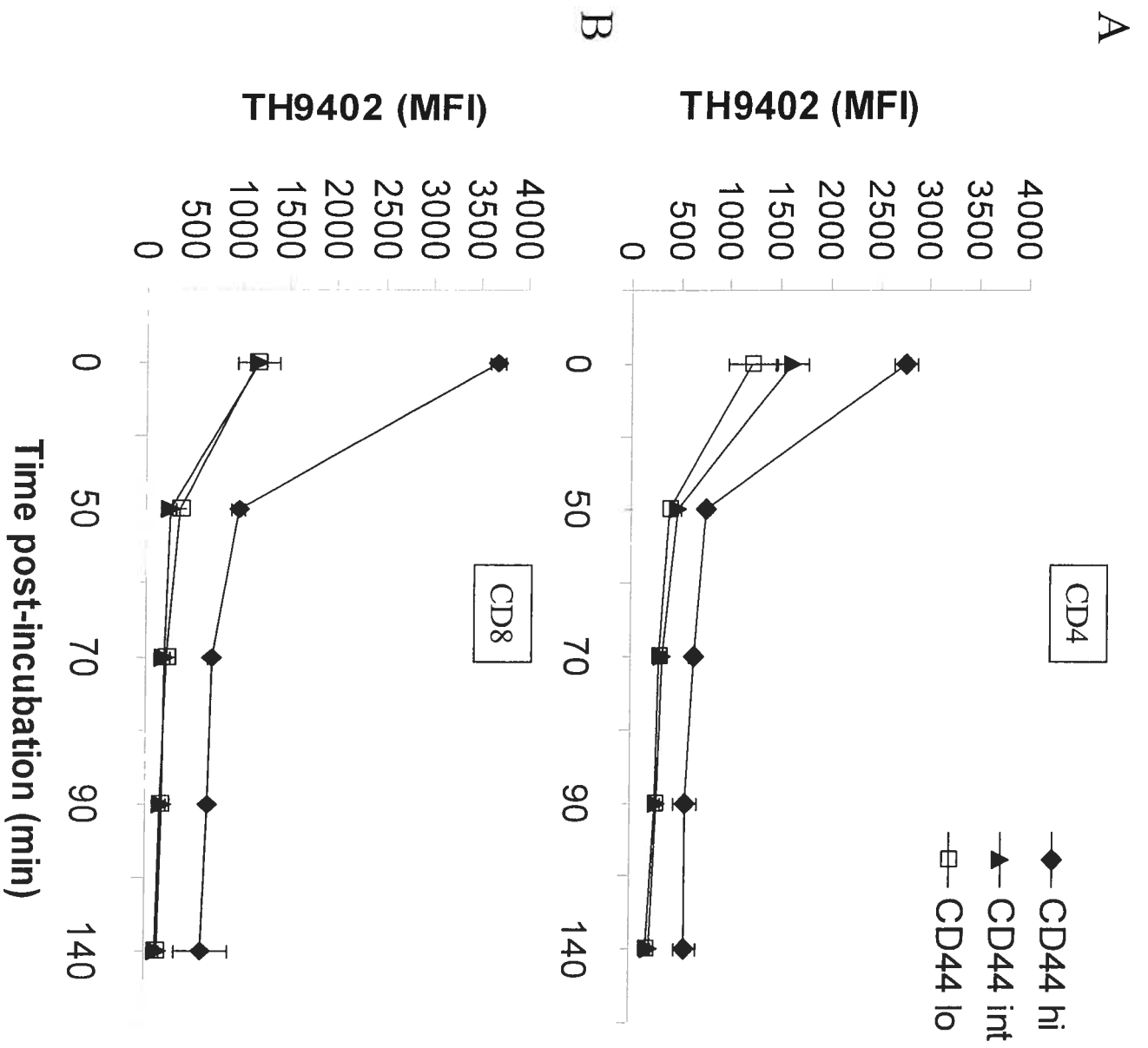


Figure 1

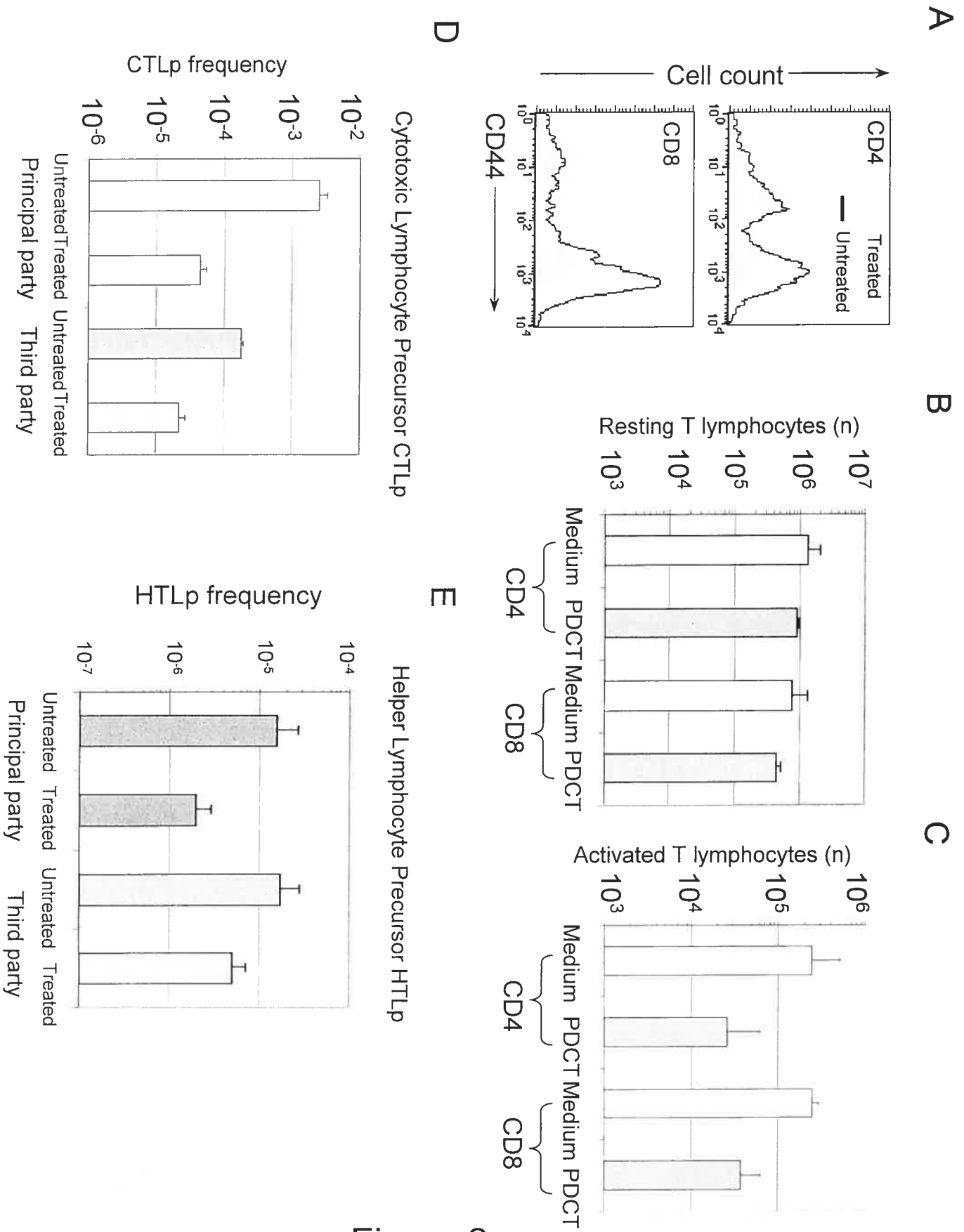


Figure 2

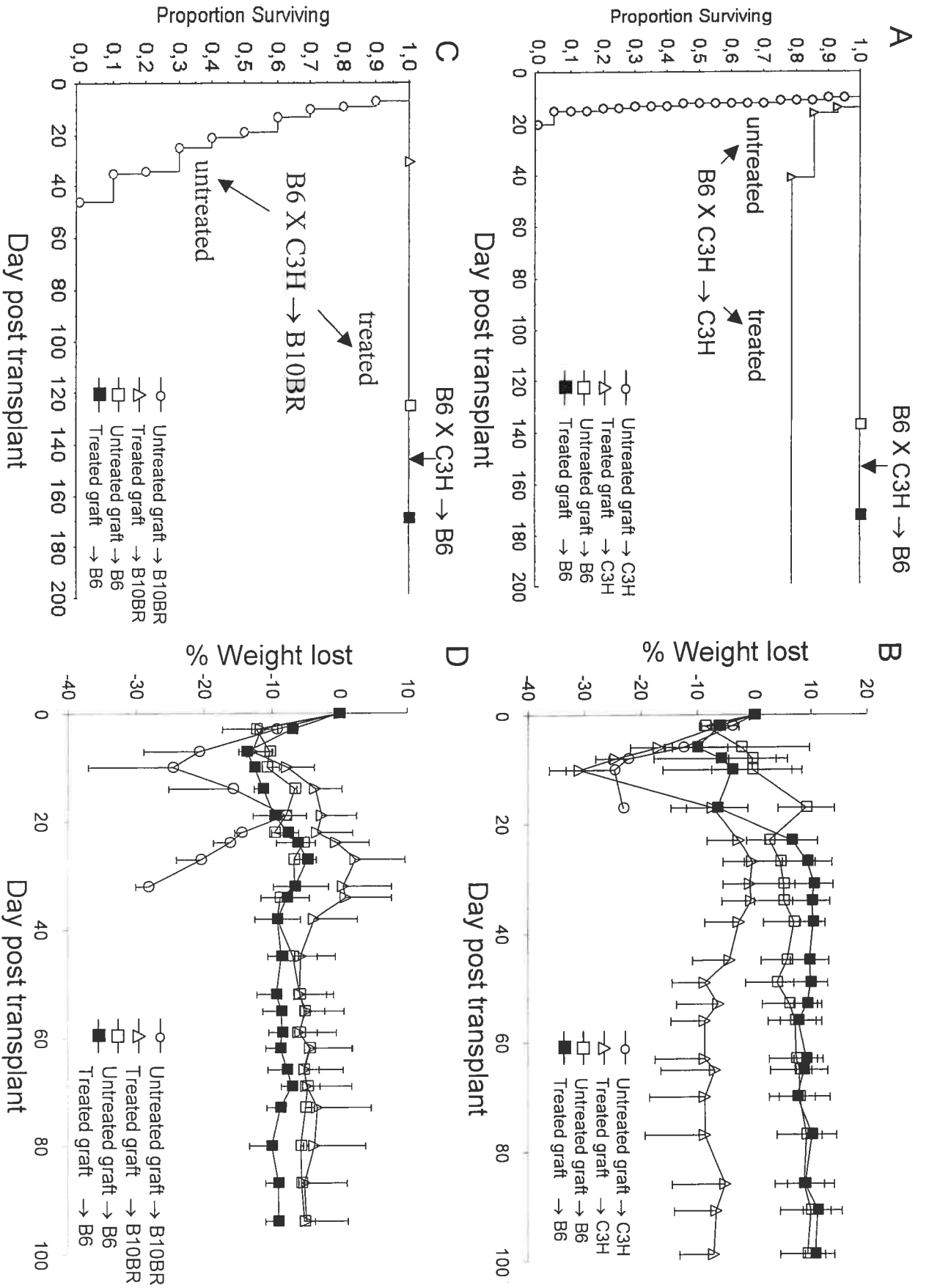


Figure 3

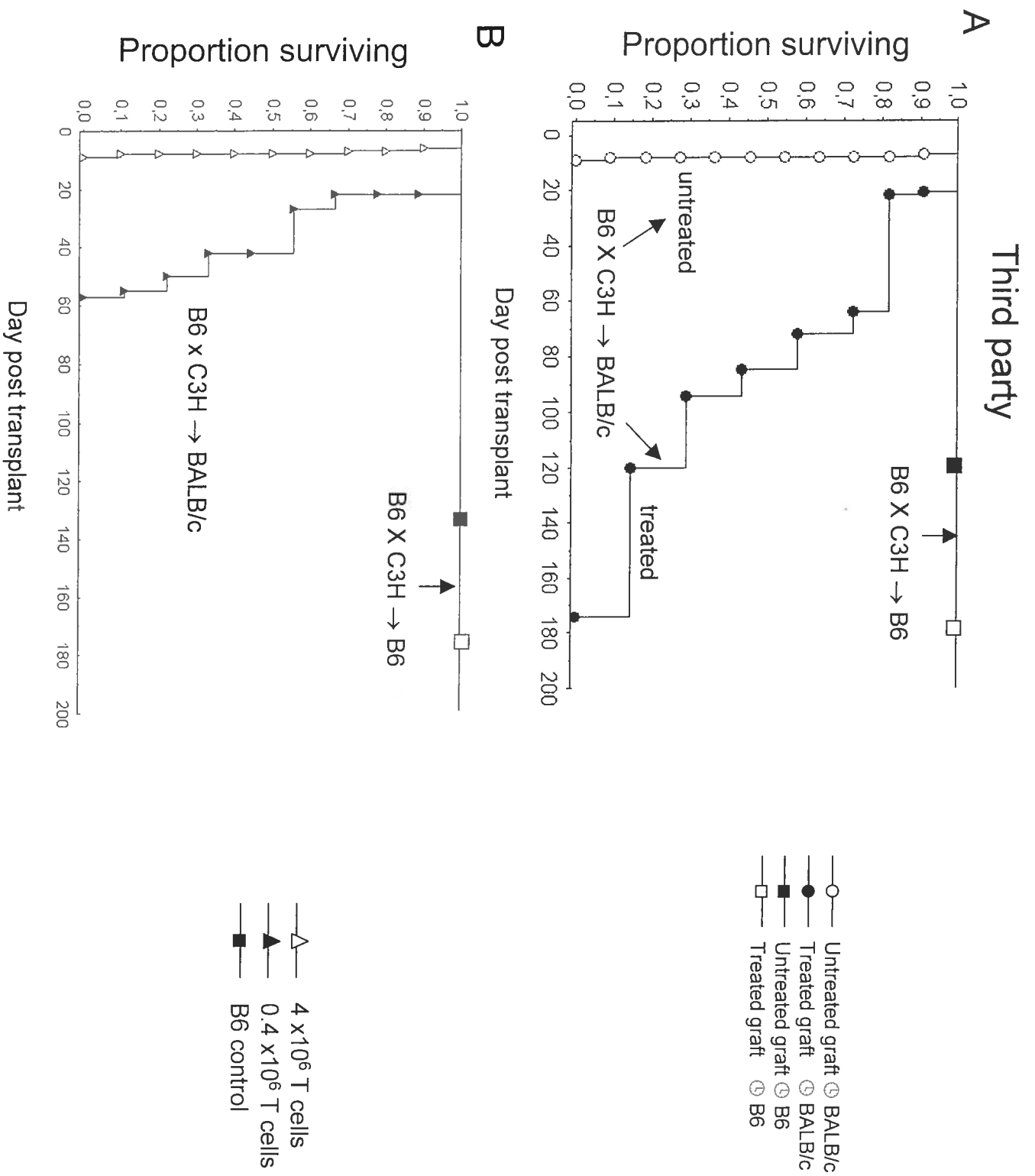


Figure 4 A, B

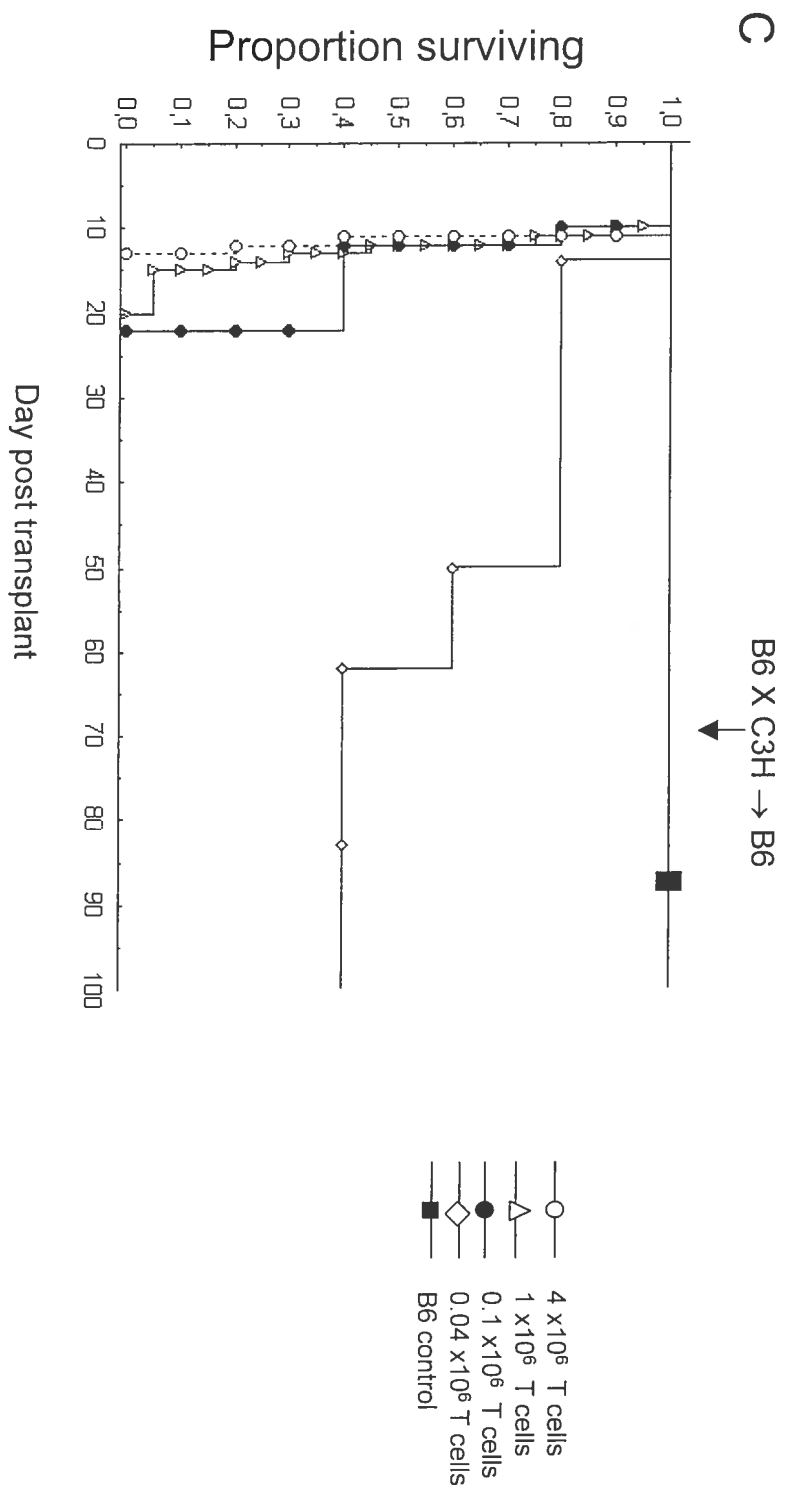
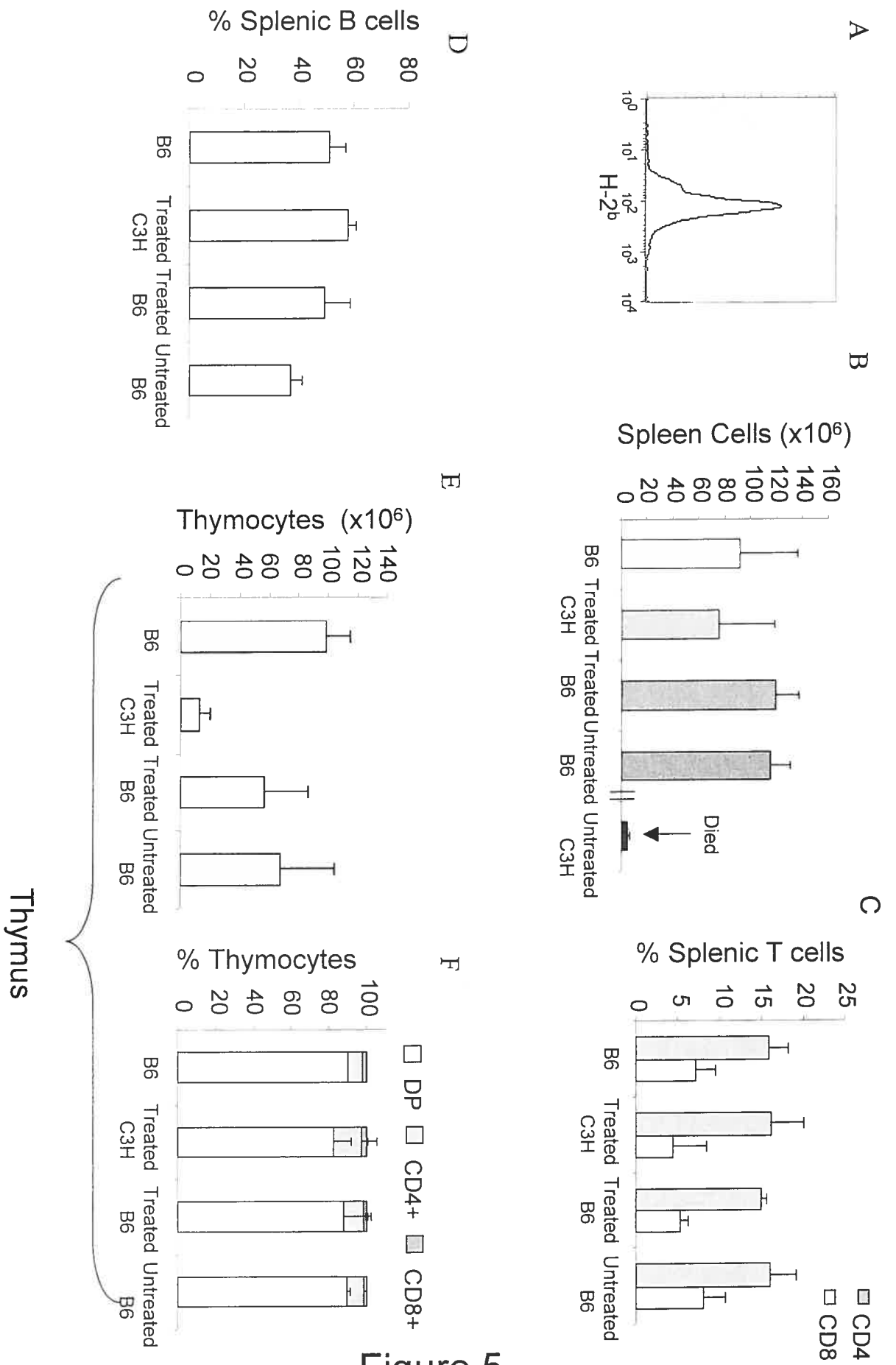


Figure 4 C



A

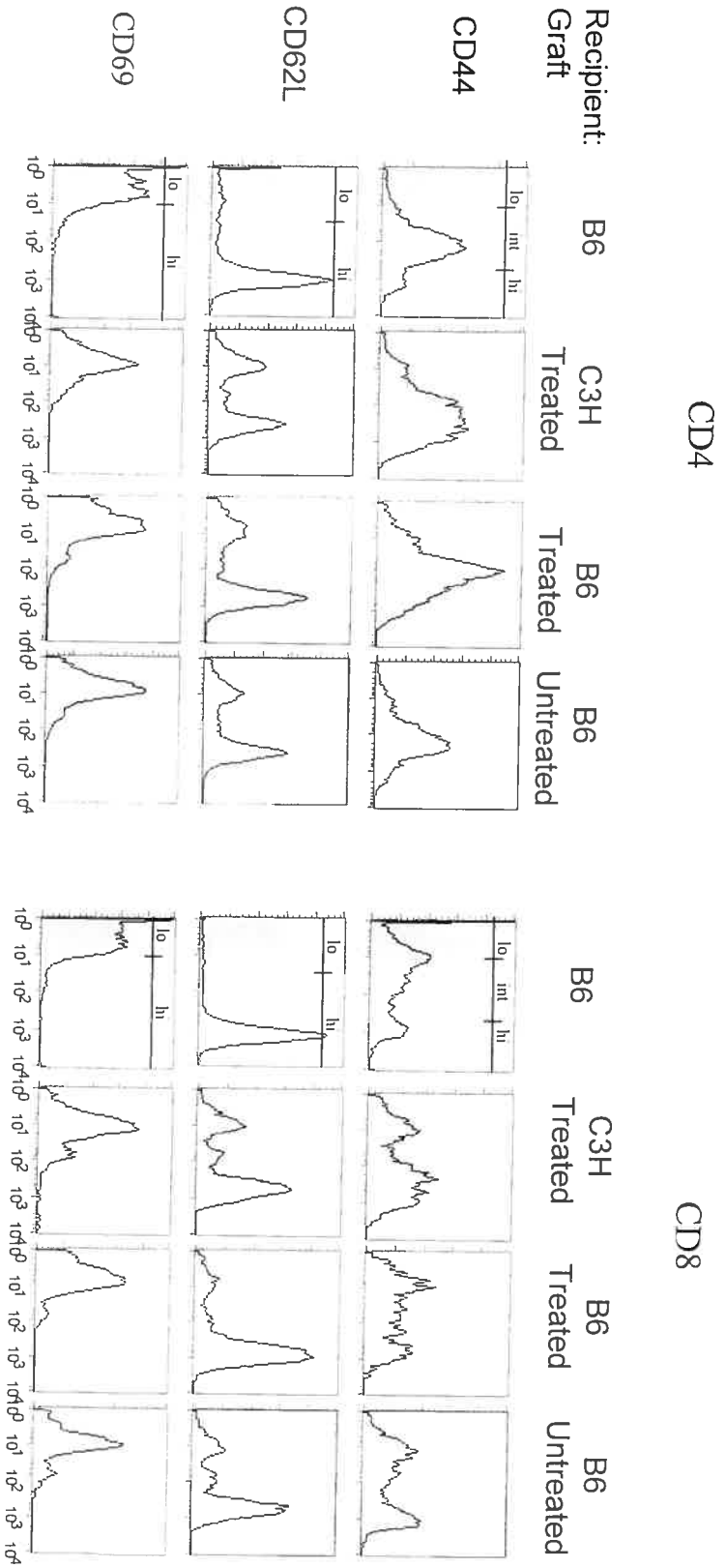


Figure 6 A

B

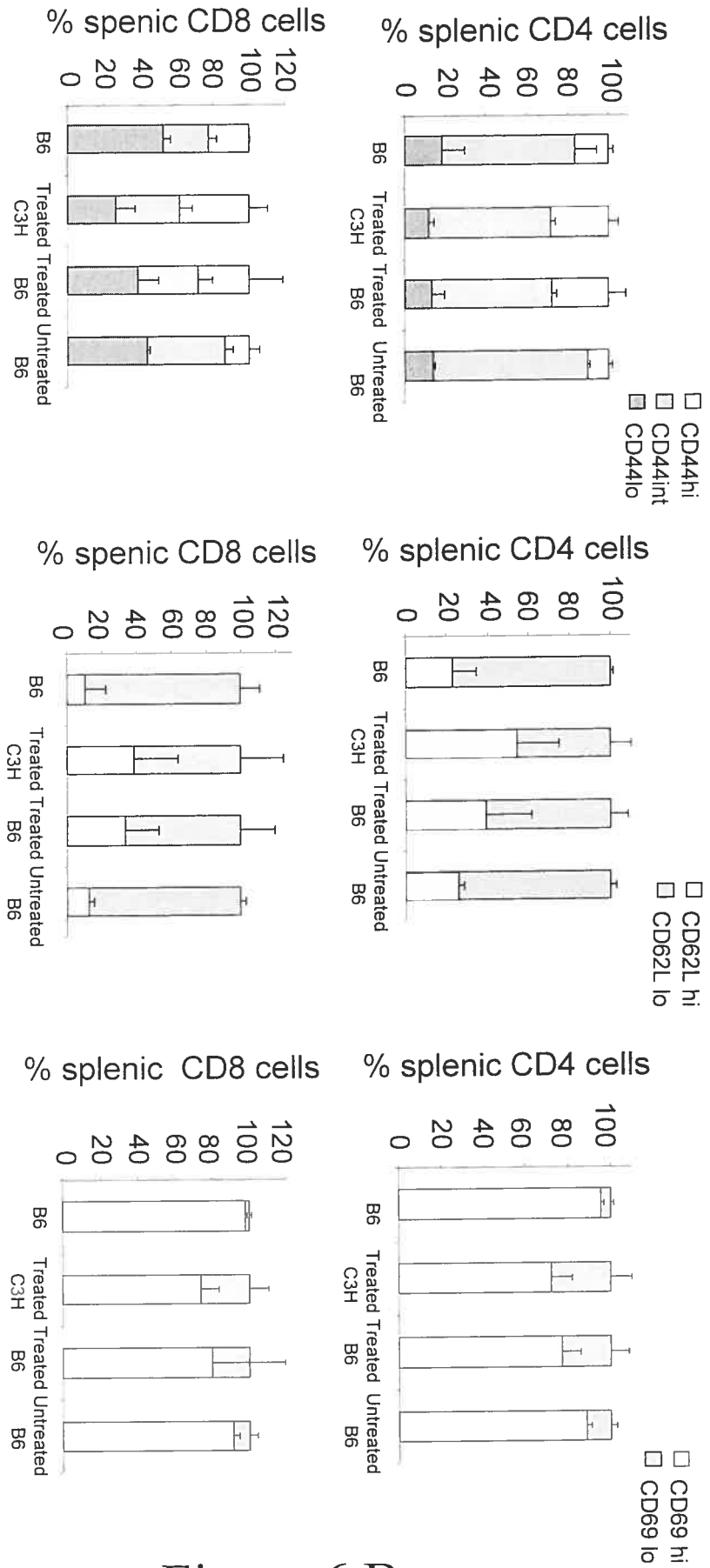


Figure 6 B

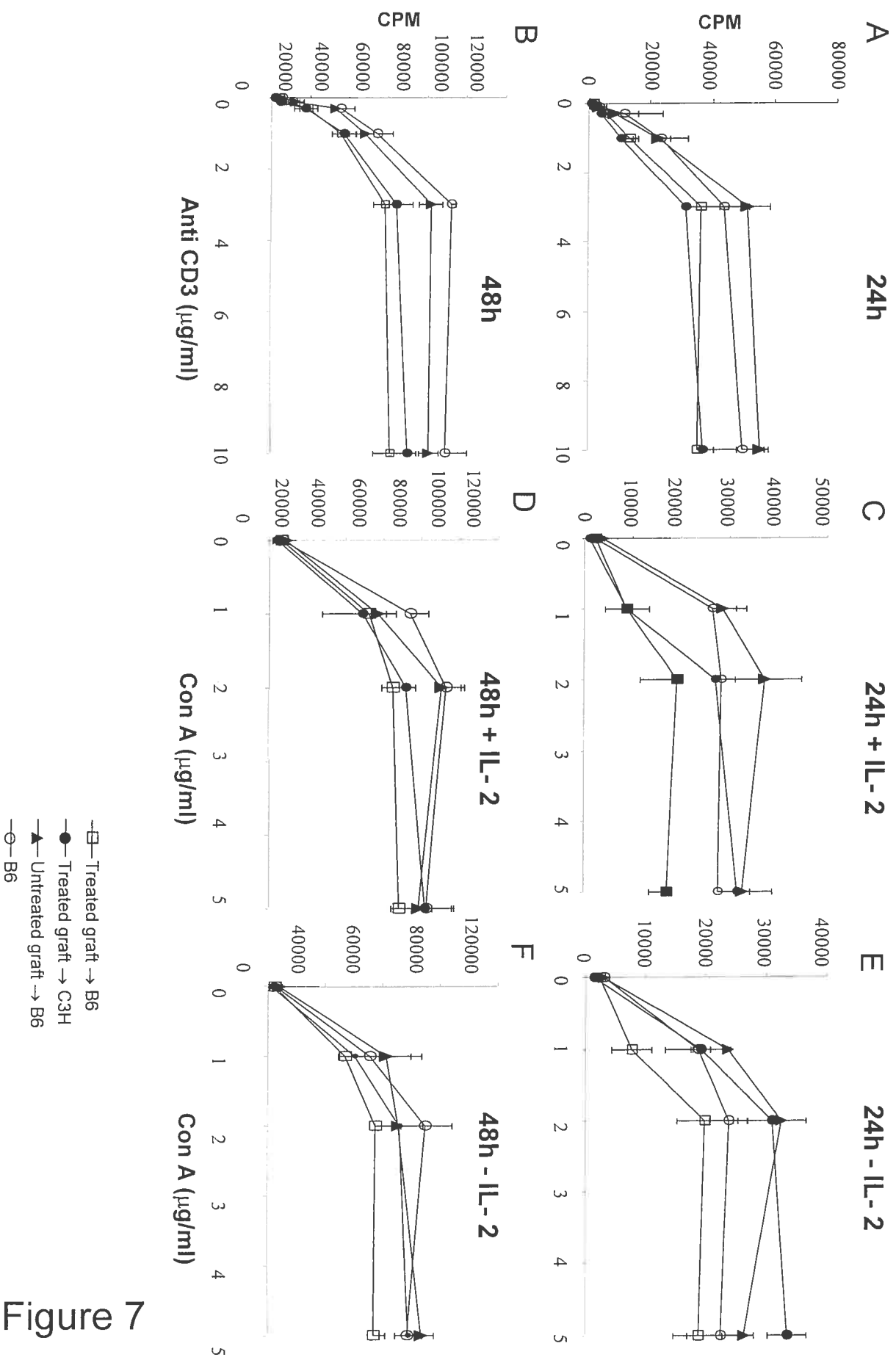


Figure 7



Troisième partie

DISCUSSION

DISCUSSION

La GVHD est aujourd'hui la complication la plus fréquente et la plus sévère de la greffe de cellules souches allogéniques et ceci malgré le grand nombre de stratégies qui ont été proposées pour la contrecarrer. Par exemple, la déplétion des cellules T qui accompagnent le greffon hématopoïétique est incontestablement une méthode très efficace pour la prévention de la GVHD, cependant, elle est souvent associée à une augmentation des complications telles que des infections virales, la rechute leucémique après la greffe et la diminution de l'effet GVL. De plus, elle ne permet pas une reconstitution satisfaisante des cellules T, ce qui engendre des complications infectieuses à répétition. Une stratégie idéale pour une immunothérapie efficace devrait donc permettre une élimination sélective des cellules réactives contre l'hôte, tout en préservant les cellules T avec d'autres spécificités antigéniques.

I. Pertinence du projet

La greffe de cellules souches allogéniques représente le seul traitement curatif pour un grand nombre de maladies auto-immunes et d'hémopathies malignes. La plupart des allogreffes sont réalisées à partir de frères ou de sœurs HLA-identiques, mais on assiste depuis ces dix dernières années à une augmentation importante du nombre de greffes réalisées à partir d'un donneur non apparenté. De plus, la difficulté à identifier un donneur potentiel génotypiquement ou phénotypiquement identique a incité les cliniciens à recourir, dans certains cas, à des greffes semi-identiques. Dans cette situation, le risque de GVHD et de HVG est accru de façon exponentielle.

Les stratégies classiques de prévention de la GVHD éliminent souvent trop de lymphocytes T et cette déplétion exhaustive et non spécifique enlève les éléments de la moelle auxiliaires qui sont nécessaires pour soutenir la prise du greffon. Il a été postulé qu'il est possible de purger sélectivement certaines populations de cellules T comme les lymphocytes alloréactifs. Une telle stratégie épargne les cellules T nécessaires pour éliminer les cellules tumorales et permet de contrôler les infections virales et fongiques.

Idéalement, elle devrait aussi épargner les cellules NK, les thymocytes matures, les monocytes et les autres éléments hématopoïétiques afin d'éviter d'augmenter le risque de rejet et de rechute néoplasique. Cette élimination sélective des cellules T alloréactives du donneur pourrait permettre une reconstitution immunologique précoce et une réponse contre les agents infectieux ainsi que préserver une activité GVL^{3,58}.

Guimond *et al*,¹¹² ont montré que la thérapie photodynamique avec le TH9402 est hautement toxique pour les lymphocytes humains T CD4⁺ et CD8⁺ stimulés suite à l'exposition à un mitogène ou à un Ag CMH du non-soi. Cette PDT préserve sélectivement les lymphocytes non activés et leur capacité à proliférer et à monter une réponse cytotoxique envers les antigènes du CMH de tiers¹¹². Elle pourrait donc avoir un intérêt clinique pour prévenir la GVHD et accélérer la reconstitution immune post-transplantation. Mon projet a donc évalué dans un modèle *in vivo* la capacité du TH9402 à prévenir la GVHD et à permettre une reconstitution immunologique.

II. Le but du projet et les résultats obtenus:

Nous avons exploré la possibilité de séparer les cellules alloréactives, responsables de la GVHD, des cellules T non alloréactives capables de générer une réponse immune contre des Ag étrangers et permettant une reconstitution immune satisfaisante. Pour cela nous avons utilisé la propriété d'élimination sélective des lymphocytes alloréactifs par thérapie photodynamique avec le TH9402 pour le traitement de la maladie du greffon contre l'hôte *in vivo* et dans un model GMO de souris H-2 incompatible.

Premièrement, ces travaux ont démontré que la PDT élimine spécifiquement les cellules T (murines) du donneur activées contre les cellules du receveur *in vitro*. Le traitement épargne les cellules non activées et préserve leur capacité à générer une réponse cytotoxique et proliférative contre des Ag autres que ceux du CMH de l'hôte.

Deuxièmement, cette propriété d'élimination sélective des cellules alloréactives *in vitro* par la PDT se traduit par la prévention de la GVHD *in vivo*. De plus, la PDT élimine spécifiquement les cellules activées tout en conservant la plupart des cellules non activées et donc la réactivité immune contre un tiers ("*third party*"), ce qui est démontré par le développement de la GVHD dans ce dernier groupe.

Troisièmement, les lymphocytes issues des souris ayant reçu un greffon allogénique traité et qui ont survécu sans développer de GVHD, présentent un phénotype immunologique semblable aux groupes syngéniques. De plus, il est intéressant de noter que la PDT semble induire, à court terme, une altération fonctionnelle des cellules T. Ce déficit, est néanmoins transitoire puisque ces dernières récupèrent rapidement leur fonction proliférative 100 jours post-greffe.

Par conséquent, la PDT permet non seulement de dépléter les lymphocytes T alloréactifs mais induit aussi une reconstitution immunologique des cellules T satisfaisante. De plus, des études réalisées en parallèle à la nôtre ont permis de montrer l'efficacité de ce traitement dans la préservation de l'effet GVL ¹¹⁷.

III. Discussion des résultats

1. Elimination des cellules T alloréactives par PDT

L'étendue de l'action de la PDT ne dépend pas uniquement de l'efficacité à produire de dérivés d'oxygène toxique mais aussi de la cinétique de rétention et d'efflux du fluorochrome des cellules. En effet, il semble que les agents photosensibilisateurs utilisés en clinique ou en recherche pour la PDT ont une propriété d'accumulation sélective dans les cellules anormales et hyperprolifératives comme les tissus cancéreux. Cette accumulation sélective, ainsi que la capacité des agents photosensibilisateurs à être activés par la lumière, constituent la base de la thérapie photodynamique. Malgré le fait que l'accent soit souvent mis sur l'efficacité de la PDT pour le traitement du cancer, il est aussi évident, depuis les dernières années, qu'un certain nombre de conditions non oncologiques puissent être sujetes à ce type de procédure.

En effet, des études utilisant le dérivé de benzoporphyrine (BPD) comme agent photosensibilisateur ont montré que les lignées tumorales (qui se divisent rapidement) ainsi que les cellules T murines activées par un agent mitogène incorporent toutes deux beaucoup plus (5-10 fois) de BPD que les lymphocytes spléniques quiescents ^{118,119}. De plus, au même titre que l'étude de Guimond *et al*, ¹¹² les lymphocytes activés qui portent

des marqueurs de surface d'activation (comme le récepteur à l'IL-2) retiennent significativement plus d'agent photosensible que ne le font les cellules non activées^{120,121}.

En se basant sur ces observations, l'évaluation de la cinétique d'incorporation du TH9402 dans les cellules T murines du donneur activées contre le receveur a été réalisée dans le but de montrer l'efficacité de la PDT *in vivo* pour prévenir la GVHD.

1.1. Cinétique d'incorporation et d'extrusion du TH9402

1.1.1. Accumulation et rétention préférentielle du TH9402 dans les cellules T activées

Les cellules T du donneur (B6) activées contre le receveur (C3H) en MLC montrent une incorporation et une rétention du TH9402 supérieures à celles des cellules T non activées. Les cellules T CD4⁺ et CD8⁺ exprimant la molécule de surface CD44 qui est une glycoprotéine de surface dont l'expression est accrue lors de l'activation des lymphocytes, incorporent plus de TH9402 que les cellules T CD44^{lo} (Figure 1). Ce qui confirme les résultats portant sur l'étude des cellules humaines. Cependant, l'étude Guimond *et al*,¹¹² prend avantage de la modulation de l'activité de la pompe Pgp, qui résulte en une rétention préférentielle différentielle et une cytotoxicité du TH9402 en fonction du processus d'activation.

1.1.2. Pourquoi il y a une rétention préférentielle dans les cellules activées ? Quel est le rôle de la Pgp ?

En ce qui concerne les cellules murines, (Figure en annexe) la différence de rétention du TH9402 entre les différentes populations activées versus non activées ne semble pas être déterminée uniquement par la présence de la pompe MDR-1. Certes l'inhibition par le vérapamil qui est un inhibiteur de la glycoprotéine-P (Pgp)¹²², montre une rétention plus importante du colorant, ce qui indique la présence de pompes au niveau des cellules

activées. Cependant, ce profil d'expression de la Pgp n'est pas exclusif, car on peut observer un effet d'inhibition au niveau des cellules non activées.

On peut voir (Figure annexe) notamment que le vérapamil semble avoir une action sur les cellules T CD8⁺ activées et non activées puisque le blocage de la Pgp conduit à une rétention du TH9402 dans les cellules T CD8⁺ CD44^{hi} et CD8⁺ CD44^{lo}. En effet, il a été montré que la sortie de la rhodamine 123 des lymphocytes T murins était médiée par la Pgp et que pratiquement toutes les cellules T CD8⁺ de souris expulsent la rhodamine 123 de manière efficace par la Pgp¹²³. De plus, les cellules CD8⁺ semblent incorporer plus de TH9402 (4000 d'intensité moyenne de fluorescence (MFI)) par rapport aux cellules T CD4⁺ (2700 MFI), ce qui est en accord avec le fait que l'activité de la Pgp dans les cellules T CD8⁺ est plus importante que dans les cellules T CD4⁺¹²².

On pourrait penser qu'une pompe comme la Pgp pourrait altérer l'action de la thérapie photodynamique sur les cellules alloréactives mais ce n'est pas le cas. Même si la fonctionnalité de la Pgp n'est pas «altérée» par l'activation comme cela a été proposé pour les cellules humaines, elle ne semble pas être suffisante pour faire sortir la totalité du colorant des cellules activées alors que les cellules non activées ont déjà expulsé la majorité du colorant après seulement 50 minutes d'efflux.

En effet, la différence entre l'intensité moyenne de fluorescence des cellules activées par rapport aux cellules non activées est suffisamment grande pour qu'elles soient épargnées après l'activation par la lumière. Nous avons en effet observé que le traitement ne semble efficace qu'avec une rétention du TH9402 correspondant à plus de 500 de MFI (données non présentées). Par conséquent, il semble que pour les cellules murines, la modulation intrinsèque du transporteur Pgp ne soit pas la cause unique de la rétention préférentielle du fluorochrome.

1.1.3. Pourquoi il y a une rétention préférentielle dans les cellules activées ?

Un rôle des mitochondries dans cet effet?

Cette accumulation préférentielle du TH9402 pourrait être due à une activité mitochondriale augmentée. En effet, ce colorant va s'incorporer sélectivement au niveau des mitochondries¹¹¹ et on sait que les agents photosensibles cationiques comme la

rhodamine 123 ont tendance à s'accumuler dans les mitochondries durant l'activation ¹²⁴. De plus, l'accumulation accrue de ces composants cationiques dans les cellules malignes comparativement aux cellules normales est probablement une réponse au grand nombre de mitochondries présentes dans les cellules avec un cycle cellulaire rapide ¹²⁵ et avec un potentiel transmembranaire augmenté ¹²⁶.

En effet, durant l'activation des lymphocytes T, la nécessité d'augmenter le métabolisme énergétique cellulaire est satisfait par une augmentation de l'activité mitochondriale. Cette dernière est responsable d'une dépolarisation transmembranaire mitochondriale suivie par une augmentation de la masse mitochondriale. Il semblerait d'ailleurs que suite à une activation des cellules T, la rétention de rhodamine 123 soit augmentée en fonction de l'expression de CD25, de la taille de la cellule et enfin de la synthèse d'ADN ¹²⁴.

1.2.Élimination des cellules T du donneur activées contre l'hôte

Les cinétiques d'accumulation du TH9402 résultent en une éradication photodynamique des cellules T du donneur activées contre le receveur dans des conditions de stimulation H-2 incompatible. Les évaluations par cytométrie en flux (Figure 2 A,B,C) démontrent que l'effet du traitement avec le TH9402 est attribuable à la déplétion d'un logarithme (log) c'est-à-dire 90% de cellules T alloréactives exprimant CD44. En effet, autant les cellules T CD4⁺ que les cellules T CD8⁺ sont sensibles à la PDT. Par contre, dans ces deux populations cellulaires, on note une élimination drastique des populations exprimant la molécule de surface CD44 et une préservation des cellules T CD44^{lo} non activées (Figure 2B,C).

Le fait qu'un certain nombre de cellules T CD44^{hi} soit encore détecté après la PDT indique que certaines cellules T activées ont soit échappé au traitement par la PDT, ou ont subi un dommage létal induit par les dommages oxydatifs médiés par la PDT mais ne sont pas encore suffisamment endommagées pour empêcher leur détection par cytométrie en flux. Une autre explication serait que ces cellules représentent des cellules mémoires/activées démontrant des propriétés biologiques leur permettant d'échapper à la PDT.

1.3.Élimination spécifique des cellules T alloreactives

L'élimination photodynamique des cellules activées se traduit aussi par une déplétion drastique des précurseurs cytotoxiques clonogéniques anti-hôte (pCTL) (Figure 2 D) ainsi qu'une déplétion un peu moins importante des précurseurs des lymphocytes T *helper* (pHTL) (Figure 2 E).

La PDT permet de dépléter spécifiquement 2 logs (99%) de pCTL du donneur activées contre le receveur alors qu'elle élimine un log (90%) de pHTL. Ces niveaux d'élimination des CTLp et HTLp sont suffisants pour empêcher le développement d'une GVHD létale dans notre modèle de souris. De plus, le fait que les études antérieures exigent 3 logs (99.9%) d'éradication globale des lymphocytes T pour prévenir la GVHD¹²⁷ suggère qu'il n'est pas nécessaire d'éliminer autant de lymphocytes T si la déplétion est spécifiquement dirigée contre les lymphocytes T alloréactifs. Il est aussi possible que l'abolition de la GVHD nécessite un moindre degré d'élimination des cellules T "helper" que pour les cellules T cytotoxiques.

Après une greffe de moelle osseuse, la diversité du TCR est diminuée de façon proportionnelle au nombre de cellules T présentes dans le greffon²⁹, il est donc crucial qu'on épargne autant de lymphocytes T que possible. La forte population de cellules CD4⁺ et CD8⁺ non alloréactives préservée après le traitement au TH9402 devrait démontrer un potentiel pour restaurer une population T diversifiée du récepteur T à travers l'expansion en réponse à un signal homéostatique^{128,129}.

En effet, à court terme, les cellules T non activées restent immunocompétentes et sont capables de proliférer en réponse à une stimulation par de nouveaux antigènes. Ceci est illustré par la capacité des cellules exposées au TH9402 à générer des CTLp et HTLp contre les antigènes de tiers. Il est intéressant de noter que malgré la perte d'un log de lymphocytes T de manière non spécifique n'est pas suffisante pour abolir la GVHD.

2. Prévention de la GVHD dans un modèle H-2 incompatible

2.1. La PDT élimine les cellules alloréactives et prévient la GVHD.

2.1.1. Prévention de la GVHD dans les souris C3H stimulatrices

Le résultat du traitement photodynamique *in vivo* dans une GMO allogénique a montré que 78 % des souris ayant reçu un greffon contenant des cellules spléniques activées et traitées survivent 100 jours post greffe (Figure 3 A, B). Au contraire, 100% des souris qui ont reçu un greffon activé et non traité développent une GVHD létale dans les 20 jours suivant la greffe. Le fait que 22 % des souris succombent au bout de 40 jours et ceci même après avoir reçu un greffon traité souligne la sévérité de la GVHD ainsi que le fait que 100% des souris contrôles meurent dans les 20 premiers jours de la greffe. Ceci est probablement relié à la forte dose d'irradiation employée pour immunosupprimer la souris receveuse ². En effet, une plus forte dose d'irradiation est associée à une relâche importante de cytokines ("cytokine storm") qui augmente l'incidence de la GVHD et la sévérité de la GVHD ¹³⁰. De plus, ceci augmente la fragilité tissulaire et le risque d'infection.

2.1.2. Prévention de la GVHD dans les souris B10BR qui ont le même fond génétique que les souris stimulatrices

Nous avons voulu tester l'efficacité du traitement sur un autre type de souris (B10BR) qui a le même haplotype H-2^k que la souris receveuse C3H (stimulatrice) (Figure 3 C, D). L'élimination par la PDT des cellules B6 activées contre C3H démontre que ce ne sont pas seulement les cellules réactives contre les cellules stimulatrices C3H qui sont éliminées mais que l'Ag ciblé est bien le CMH distinct. De plus, le résultat de la PDT semble encore plus efficace (100 % de survie) contre la souris B10BR que contre la souris C3H.

Il faut également noter que les souris B10BR ayant reçu un greffon non traité développent une GVHD moins sévère que dans le groupe C3H (Figure 3 D), ce qui pourrait expliquer la meilleure efficacité du traitement. Cependant, il semblerait plutôt que la différence entre la GVHD induite dans les souris B10BR et celle induite dans les souris C3H soit due probablement à d'autres types d'antigènes différents des antigènes majeurs. En effet, des différences au niveau des antigènes mineurs d'histocompatibilité existent entre les souris B10BR et C3H. On pourrait expliquer aussi cette différence par le fait que les souris B6 et B10BR ont toutes deux une ontogénie commune par exemple elles possèdent des superantigènes Mls-b identiques, alors que la souris C3H possède un Mls-c¹³¹.

Les superantigènes Mls sont des molécules susceptibles de se lier à des molécules du CMH de classe II et à des séquences peptidiques caractéristiques de certaines familles de TCR. Ces superantigènes activent un grand nombre de clones T, indépendamment du peptide reconnu par leur TCR en association avec la molécule du CMH de la CPA. Chez la souris, on retrouve l'Ag Mls codé par un gène d'un rétrovirus de tumeur mammaire (MMTV).

Par conséquent, la PDT prévient la GVHD en éliminant non seulement les cellules T du donneur activées contre les cellules simulatrices mais aussi contre l'haplotype des ces cellules (B10BR). Ces résultats confirment l'importance des antigènes du CMH comme immunostimulateurs majeurs et antigènes cibles de la GVHD.

2.1.3. L'hypothèse du développement d'une GVHD chronique dans certaines souris traitées est-elle possible ?

La perte de poids observée dans certaines des souris receveuses C3H traitées pourrait être reliée à l'apparition d'une GVHD chronique. De plus, le fait que cette diminution du poids ne se produit pas dans les souris receveuses B10BR indiquerait l'influence d'une disparité antigénique plus grande entre le donneur et le receveur C3H qu'entre le donneur B6 et le receveur B10BR. En effet, il est possible qu'il y ait une forte réponse dans la combinaison B6 anti Mls-c de C3H suffisante pour initier et soutenir une réponse

plus forte de cytokines nécessaire pour conduire une réponse CTL alors que la combinaison B6 anti Mls-b de B10BR ne stimule pas de réponse ¹³¹.

Cependant, cette possibilité reste très hypothétique dans notre cas, étant donné que les souris qui ont survécu à la PDT ne présentent aucun signe clinique de GVHD chronique. Par conséquent, il serait intéressant de déterminer si ces souris traitées à la PDT développent des signes de GVHD chronique, qui pourraient par exemple être détectés en dosant les anticorps anti-ADN simple brin et ADN double brin et des Ac contre des antigènes nucléaires dans le sérum. De plus, il sera utile d'évaluer les coupes histologiques au niveau de certains organes tels que l'intestin, le foie afin de confirmer ou d'infirmer la présence d'une GVHD chronique dans ces souris.

2.2.Efficacité du traitement contre le third party.

2.2.1. Réactivité contre un tiers receveur

La PDT permet de prévenir la GVHD aiguë dans les souris receveuses C3H mais est-ce que cette élimination est spécifique ?

Il était important d'évaluer si la prévention de la GVHD était spécifique ou dépendait du nombre de lymphocytes T administrés. Nous avons donc procédé à l'injection de 4×10^6 à 0.1×10^6 cellules spléniques de B6 activées contre C3H et de moelle osseuse de B6 déplétée en cellules T dans le receveur irradié C3H (Figure 4 C). Or ces faibles nombres de lymphocytes T conduisent à une GVHD aiguë létale 20 jours post-greffe qui se manifeste par une diarrhée, la perte de poils, de la fièvre et un état fébrile de la souris. La même dose n'induit pas de GVHD dans le groupe syngénique (B6 activée contre C3H dans B6). Il est important de mentionner qu'une dose aussi petite que 0.04×10^6 cellules T activées peut induire 60% de mortalité. Comme on injecte 4×10^6 cellules activées pour induire une GVHD létale, même avec une perte d'un log de lymphocytes alloréactifs (Figure 2 D, E) de manière non spécifique après la PDT, une réactivité contre le donneur est préservée puisque 0.4×10^6 de cellules sont suffisantes pour induire une GVHD dans 100% des souris et dans le même intervalle de temps.

L'administration des cellules activées et traitées par PDT induit une GVH létale dans plusieurs lignées BALB/c, (SJL/J et DBA/1 données non présentées) de souris génétiquement différentes de la souris C3H (Figure 4 A). Or l'administration de ces mêmes cellules dans l'hôte qui a servi à la stimulation initiale (procédure qui devrait augmenter l'alloréactivité spécifique) mène à l'absence de GVHD. Ceci indique que la PDT élimine spécifiquement les cellules activées tout en conservant la plupart des cellules non activées. Cette thérapie préserve donc les lymphocytes T qui sont dirigés contre des antigènes du receveur auxquels ils n'ont pas été exposés préalablement.

2.2.2. La réactivité contre le *third party* est tardive

Bien que le traitement n'affecte pas la réactivité contre un tiers receveur et que la GVHD soit induite, elle survient de façon un peu plus tardive que dans le groupe contrôle. En effet, 80 % des souris BALB/c développent une GVHD létale mais au bout de 70 jours post greffe (Figure 4A).

Les tests LDA indiquaient une perte non spécifique d'un log de lymphocytes T alloréactifs contre le *third party* BALB/c (Figure 2 D, F). Afin de s'assurer que cette perte ne soit pas suffisante à abolir la GVHD et surtout qu'elle ne provoque pas le délai observé, nous avons injecté à des souris BALB/c irradiées un nombre inférieur de cellules T activées (0.4×10^6 T) (Figure 4 B). Cette quantité correspond à une perte d'un log par rapport à la dose normalement administrée (4×10^6 T). Le résultat montre que nous induisons une GVHD létale avec 0.4×10^6 T dans les souris BALB/c ne dépassant pas 56 jours post greffe (Figure 4 B).

Par conséquent, bien que la GVHD survienne de façon un peu plus tardive après la PDT que le groupe contrôle, cette différence ne semble pas entièrement attribuable à un effet de dose cellulaire.

2.2.3. Inhibition temporaire de la réactivité lymphocytaire T

Le délai observé avant l'induction de la GVHD dans le "third party" pourrait être expliqué par la présence d'une inhibition temporaire due aux effets indirects de la PDT. La thérapie photodynamique médiée par le TH9402 induit l'élimination des cellules T activées principalement par la voie apoptotique (données non présentées). Des études ont montré que la clairance de telles cellules apoptotiques par des cellules comme les macrophages pouvait conduire à la sécrétion de cytokines (IL-10) pouvant être immunosuppressives pour les cellules T^{132,133}. Ceci suggère qu'une fois que les cellules activées sont éliminées par PDT, elles pourront exercer un effet inhibiteur sur les cellules T non alloréactives via la sécrétion de cytokines inhibitrices¹³⁴.

De plus, une mort lymphocytaire massive peut être associée à une présentation immunogénique d'antigènes du soi intracellulaire qui pourra être responsable de l'apparition de l'autoimmunité¹³⁵.

En conclusion, nous proposons que la PDT génère un effet d'inhibition temporaire de la réactivité lymphocytaire T. Cette effet pourrait être causé par une relâche de produits de dégradation lors de l'élimination des lymphocytes activés, par une production secondaire de cytokines inhibitrices, ou encore par un effet direct de l'agent photosensible sur les lymphocytes T au repos. Les niveaux de TH9402 dans les cellules T au repos pouvant être trop faibles pour les éliminer, mais suffisants pour altérer transitoirement leur réponse immune.

3. Reconstitutions immune 100 jours post greffe

3.1. Analyse phénotypique des lymphocytes T et B.

Les méthodes conventionnelles de déplétion de lymphocytes se heurtent souvent à un problème de taille qui est la mauvaise reconstitution immune post-greffe. Ceci augmente le risque de complications infectieuses. Il est donc possible de prévenir la GVHD de manière efficace en éliminant les cellules T alloréactives responsables de la

maladie mais la nécessité d'épargner les cellules T non allo-réactives est essentielle pour permettre une reconstitution immunitaire efficace du receveur. En effet, la plupart des patients qui ont reçu une greffe déplétée en cellules T auront un déficit en cellules T de façon plus marquée au niveau des cellules T $CD4^+$ et un ratio $CD4^+/CD8^+$ inversé et ceci pendant les deux premières années¹³⁵. De plus, la lymphopoïèse est déficiente au niveau des populations de cellules B

3.1.1. L'atrophie thymique

Dans notre étude, nous détectons dans les receveurs allogéniques traités 100-150 jours post greffe (Figure 5 E), une cellularité thymique diminuée par rapport au groupe syngénique (mais non statistiquement significative) et cette différence est plus grande par rapport à une souris normale (120×10^6) (statistiquement significative). Par contre, les ratios double positif $CD4^+CD8^+$, simple positif $CD4^+CD8^-$ et $CD4^-CD8^+$ restent normaux (Figure 5 F). Cette atrophie thymique observée, en général, dans tous les groupes transplantés pourrait être associée à la dose de radiothérapie administrée. De plus, il est fort possible que l'atrophie observée chez les souris C3H ayant reçu un greffon allogénique traité ne soit pas observée dans le cas des receveurs B10BR.

Un autre cas de figure pourrait être considéré et qui est celui du développement d'une GVHD chronique. En effet, le développement d'une réactivité contre les molécules du soi au cours de la maturation des cellules T dans le thymus endommagé peut être responsable de l'apparition de manifestations auto-immunes de la GVHD chronique. Étant donné que le thymus de l'hôte est très endommagé, des erreurs dans la délétion des cellules T réactives contre l'hôte peuvent donc contribuer à l'auto-réactivité. D'ailleurs, Onoe et Hollander ont démontré que l'échec dans la délétion clonale de populations T exprimant la chaîne du TCR $V\beta$ réactive contre les antigènes de l'hôte pouvait conduire à des manifestations auto-immunes⁸⁵. Néanmoins, cette hypothèse est peu plausible étant donné que des expériences préliminaires concernant la diversité du répertoire $V\beta$, ont montré que les souris C3H ayant reçu un greffon allogénique traité ont un répertoire $V\beta$ aussi diversifié qu'un contrôle syngénique (données non présentées).

Par conséquent, l'atrophie thymique semble attribuable à la forte irradiation mais aussi à la sévérité du modèle de GVHD utilisé.

3.1.2. Le phénotype des lymphocytes T dans la rate des souris greffées est normale

A l'inverse du thymus, la rate et les ganglions des souris greffées avec des cellules T activées et traitées ont une cellularité et un ratio $CD4^+/CD8^+$ normale (Figure 5 B, C). De plus, le nombre de lymphocytes B (Figure 5 D) présents dans la rate de ces souris est identique à celui des souris contrôles. L'analyse des marqueurs d'activation (Figure 6 A, B) des cellules T indique que les cellules T $CD4^+$ et $CD8^+$ provenant de souris C3H ayant reçu un greffon allogénique traité ont un phénotype semblable au contrôle syngénique B6 par rapport à une souris normale non greffée. Cependant, on observe une légère augmentation du nombre de lymphocytes T avec un phénotype mémoire/activé ($CD44^{hi}$ $CD62L^{lo}$) dans le groupe allogénique ou syngénique (Figure 6 B). Cette augmentation du nombre de cellules T mémoires versus les cellules T naïves pourrait être due à l'expansion homéostatique des cellules T activées résiduelles dans le greffon suite au traitement de radiothérapie qui rend les hôtes lymphopéniques dans les premiers jours post- greffe.

Plusieurs études ont démontré que les cellules T $CD8^+$ dans les hôtes lymphopéniques peuvent temporairement acquérir un phénotype mémoire durant leur prolifération homéostatique mais une fois que la cellularité des compartiments lymphoïdes est restaurée, ils regagneront leur caractéristique phénotypique et leur caractéristique fonctionnelle de cellules T naïves^{136,137}. On peut émettre l'hypothèse que la reconstitution des cellules T dans nos receveurs de GMO allogénique résulte en une conversion temporaire des cellules T nouvellement générées en cellules T mémoires/activées après avoir rencontré un environnement lymphopénique et ceci au cours de la période juste après la transplantation de l'hôte.

Nous n'avons retrouvé une différence significative que pour le phénotype $CD4^+CD44^{hi}$ et $CD8^+CD44^{hi}$, et ce entre les souris C3H ayant reçu un greffon traité par rapport à une souris normale ou encore un contrôle syngénique non traité. Ceci peut

nous amener à penser que l'atrophie thymique est responsable de ce phénotype. Cependant, nos souris ne présentent aucun signe de lymphopénie au niveau splénique ou ganglionnaire.

Par conséquent, la reconstitution immune des souris qui ont reçu un greffon traité et qui ont survécu présente des caractéristiques phénotypiques semblables à celles du groupe syngénique. Ces résultats montrent que la PDT peut sélectivement éliminer les cellules T alloréactives et empêcher le développement de la GVHD *in vivo*, dans un modèle murin tout en permettant une reconstitution globalement semblable à celle du modèle syngénique.

3.2. Analyse fonctionnelle des cellules T.

Des études réalisées *in vitro* montrent qu'après une GMO, les cellules T présentent une réponse proliférative réduite au stimulus mitogénique, une fonction effectrice des cellules T cytotoxiques anormales et une capacité à collaborer avec les cellules B qui est diminuée ¹⁰¹. De plus, le rétablissement fonctionnel des cellules T semble être encore plus diminué après déplétion de lymphocytes.

Nous avons voulu donc évaluer la capacité des cellules issues de ces souris greffées à proliférer en réponse à une stimulation mitogénique en présence ou en absence de l'IL-2 (Figure 7 C- F) ou par une stimulation par un anticorps reconnaissant la molécule CD3 du TCR (Figure 7 A, B). Les cellules T provenant des souris traitées ayant survécu 100 jours post-greffe prolifèrent en réponse à la stimulation par la concanavaline A (une lectine permettant l'activation polyclonale des cellules T) mais aussi par activation avec un anticorps dirigé contre la molécule de surface CD3.

Les cellules provenant de souris qui ont reçu un greffon allogénique incompatible et traité par PDT sont fonctionnelles 100 jours post greffe puisqu'elles répondent de manière efficace aux deux types de stimulations. D'ailleurs, il n'existe pas de différence significatives entre les différents groupes. Ceci indique donc que la PDT n'induit pas de déficit immunitaire à long terme.

En conclusion, le traitement du greffon par PDT prévient non seulement la GVHD létale, mais prévient même le développement du déficit immunologique habituellement retrouvé en association avec la GVHD, confirmant l'efficacité de ce traitement. De plus, les études de Chao N *et al*,¹¹⁷ en 2002 indiquent que ce traitement épargne non seulement les cellules T capables de réagir contre des antigènes étrangers mais aussi contre des antigènes tumoraux tout en conservant l'effet GVL.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La greffe de cellules souches allogéniques représente le seul traitement curatif pour un grand nombre de maladies auto-immunes et d'hémopathies malignes. La maladie du greffon contre l'hôte et la mauvaise reconstitution immune représentent cependant deux obstacles majeurs au succès et à l'efficacité de cette procédure. Plusieurs stratégies permettent la prévention de la GVHD mais elles éliminent souvent trop de lymphocytes T et cette déplétion exhaustive et non spécifique enlève les éléments de la moelle auxiliaires qui sont nécessaires pour soutenir la prise du greffon et la reconstitution immune à long terme. Une élimination sélective des cellules T alloréactives du donneur pourrait permettre une reconstitution immunologique précoce et une réponse contre les agents infectieux ainsi que préserver une activité GVL.

De précédentes études ¹¹³ dans notre laboratoire ont montré que la thérapie photodynamique (PDT), avec l'aide 4.5 dibromorhodamine méthyl ester (TH9402), permet d'éliminer les cellules T alloréactives humaines et de préserver sélectivement les lymphocytes non alloréactifs ainsi que leur capacité à proliférer et à monter une réponse cytotoxique envers les antigènes du CMH de tiers. Les travaux menés au cours de ce projet de maîtrise a permis de montrer que cette PDT permettait de séparer les cellules alloréactives, responsables de la GVHD, des cellules T non alloréactives capables de générer une réponse immune contre des Ag étrangers et permettant une reconstitution immune satisfaisante. Ces travaux ont démontré que la PDT élimine spécifiquement les cellules T (murines) du donneur activées contre les cellules du receveur *in vitro*. Le traitement épargne non seulement les cellules non activées mais préserve aussi leur capacité à générer une réponse cytotoxique et proliférative contre des Ag autres que ceux du CMH de l'hôte. Cette propriété d'élimination sélective des cellules alloréactives *in vitro* par la PDT se traduit par la prévention de la GVHD *in vivo*. De plus, la PDT élimine spécifiquement les cellules activées tout en conservant la plupart des cellules non activées et donc la réactivité immune contre un tiers ("*third party*"), ce qui est démontré par le développement de la GVHD dans ce dernier groupe.

Les lymphocytes de souris ayant reçu un greffon allogénique traité et qui ont survécu sans développer de GVHD, présentent un phénotype immunologique semblable aux groupes syngéniques. De plus, il est intéressant de noter que la PDT semble induire, à court terme, une altération fonctionnelle des cellules T. Ce déficit est néanmoins transitoire puisqu'elles récupèrent rapidement leur fonction proliférative 100 jours post-greffe.

Par conséquent, nous avons démontré que la PDT est efficace dans l'élimination des cellules T réactives contre les antigènes de CMH des cellules stimulatrices. Il serait particulièrement intéressant d'évaluer l'effet de la PDT sur des cellules T stimulées par un antigène mineur d'histocompatibilité. De plus, le fait que les cellules T traitées répondent aux antigènes majeurs du "third party" indique la préservation de la signalisation des cellules T ainsi que les voies effectrices. Ceci devrait se traduire en une élimination des invasions fongiques et virales.

Dans des études futures, il serait intéressant de retracer la nature des cellules T qui échappent à l'élimination par la PDT avec le TH9402 ainsi que des autres populations de cellules comme les cellules NK et les cellules B. En effet, ces populations contribuent à la prévention des complications immunologiques et infectieuses de la greffe.

Par ailleurs, les lymphocytes provenant d'un receveur de moelle osseuse déplétée en cellules T ont un répertoire TCR de variabilité significativement restreinte ¹⁰². Des résultats préliminaires ont montré que le répertoire des souris C3H traitées ayant survécu 100 jours post greffe, présentent un répertoire V β polyclonale et diversifié semblable à celui du contrôle.

Il serait intéressant d'étudier la reconstitution immune particulièrement dans le thymus dans les souris B10BR qui ne semblent pas présenter de perte de poids comme c'est le cas pour les souris C3H et évaluer le répertoire des lymphocytes T issus de ces souris.

Nos travaux apportent une nouvelle stratégie de prévention de la GVHD permettant une reconstitution immune efficace et une réponse contre des antigènes étrangers.

REFERENCES

Reference List

1. Theobald,M. Allorecognition and graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant.* **15**, 489-498 (1995).
2. Hill,G.R. *et al.* Total body irradiation and acute graft-versus-host disease: the role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines. *Blood* **90**, 3204-3213 (1997).
3. Blazar,B.R., Korngold,R. & Valleria,D.A. Recent advances in graft-versus-host disease (GVHD) prevention. *Immunol. Rev.* **157**, 79-109 (1997).
4. Murphy,W.J. & Blazar,B.R. New strategies for preventing graft-versus-host disease. *Curr. Opin. Immunol.* **11**, 509-515 (1999).
5. Marmont,A.M. *et al.* T-cell depletion of HLA-identical transplants in leukemia. *Blood* **78**, 2120-2130 (1991).
6. Horowitz,M.M. *et al.* Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* **75**, 555-562 (1990).
7. Storek,J. *et al.* Immune reconstitution after allogeneic marrow transplantation compared with blood stem cell transplantation. *Blood* **97**, 3380-3389 (2001).
8. Verma,U.N. & Mazumder,A. Immune reconstitution following bone marrow transplantation. *Cancer Immunol. Immunother.* **37**, 351-360 (1993).
9. Witherspoon,R.P. *et al.* Recovery of in vivo cellular immunity after human marrow grafting. Influence of time postgrafting and acute graft-versus-host disease. *Transplantation* **37**, 145-150 (1984).
10. Keable,H. *et al.* Long-term study of chimaerism in bone marrow transplantation recipients for severe aplastic anaemia. *Br. J. Haematol.* **71**, 525-533 (1989).
11. Small,T.N. *et al.* B-cell differentiation following autologous, conventional, or T-cell depleted bone marrow transplantation: a recapitulation of normal B-cell ontogeny. *Blood* **76**, 1647-1656 (1990).
12. Bosserman,L.D. *et al.* Mechanism of graft failure in HLA-matched and HLA-mismatched bone marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant.* **4**, 239-245 (1989).
13. Butturini,A., Seeger,R.C. & Gale,R.P. Recipient immune-competent T lymphocytes can survive intensive conditioning for bone marrow transplantation. *Blood* **68**, 954-956 (1986).

14. Sheridan,W.P. *et al.* Granulocyte colony-stimulating factor and neutrophil recovery after high-dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation. *Lancet* **2**, 891-895 (1989).
15. Gabrilove,J. The development of granulocyte colony-stimulating factor in its various clinical applications. *Blood* **80**, 1382-1385 (1992).
16. Pechumer,H., Leinisch,E., Bender-Gotze,C. & Ziegler-Heitbrock,H.W. Recovery of monocytes after bone marrow transplantation--rapid reappearance of tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 production. *Transplantation* **52**, 698-704 (1991).
17. Zander,A.R. *et al.* Immune recovery following allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation* **40**, 177-183 (1985).
18. Asai,O. *et al.* Suppression of graft-versus-host disease and amplification of graft-versus-tumor effects by activated natural killer cells after allogeneic bone marrow transplantation. *J. Clin. Invest* **101**, 1835-1842 (1998).
19. Ruggeri,L. *et al.* Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* **94**, 333-339 (1999).
20. Storek,J. & Saxon,A. Reconstitution of B cell immunity following bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **9**, 395-408 (1992).
21. Small,T.N. *et al.* B-cell differentiation following autologous, conventional, or T-cell depleted bone marrow transplantation: a recapitulation of normal B-cell ontogeny. *Blood* **76**, 1647-1656 (1990).
22. Mitus,A.J. *et al.* Monoclonal and oligoclonal gammopathy after bone marrow transplantation. *Blood* **74**, 2764-2768 (1989).
23. Witherspoon,R.P., Lum,L.G. & Storb,R. Immunologic reconstitution after human marrow grafting. *Semin. Hematol.* **21**, 2-10 (1984).
24. Mori,T. *et al.* Cellular interactions in marrow-grafted patients. I. Impairment of cell-mediated lympholysis associated with graft-vs-host disease and the effect of interleukin 2. *J. Immunol.* **130**, 712-716 (1983).
25. Witherspoon,R.P. *et al.* Recovery of antibody production in human allogeneic marrow graft recipients: influence of time posttransplantation, the presence or absence of chronic graft-versus-host disease, and antithymocyte globulin treatment. *Blood* **58**, 360-368 (1981).
26. Soiffer,R.J. *et al.* Reconstitution of T-cell function after CD6-depleted allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* **75**, 2076-2084 (1990).

27. Pignata,C. *et al.* Defective activation of mitogen-activated protein kinase after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* **88**, 2334-2341 (1996).
28. Zander,A.R. *et al.* Immune recovery following allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation* **40**, 177-183 (1985).
29. Roux,E. *et al.* Recovery of immune reactivity after T-cell-depleted bone marrow transplantation depends on thymic activity. *Blood* **96**, 2299-2303 (2000).
30. Dumont-Girard,F. *et al.* Reconstitution of the T-cell compartment after bone marrow transplantation: restoration of the repertoire by thymic emigrants. *Blood* **92**, 4464-4471 (1998).
31. Mackall,C.L., Granger,L., Sheard,M.A., Cepeda,R. & Gress,R.E. T-cell regeneration after bone marrow transplantation: differential CD45 isoform expression on thymic-derived versus thymic-independent progeny. *Blood* **82**, 2585-2594 (1993).
32. Mackall,C.L. *et al.* Age, thymopoiesis, and CD4+ T-lymphocyte regeneration after intensive chemotherapy. *N. Engl. J. Med.* **332**, 143-149 (1995).
33. Rocha,B., Dautigny,N. & Pereira,P. Peripheral T lymphocytes: expansion potential and homeostatic regulation of pool sizes and CD4/CD8 ratios in vivo. *Eur. J. Immunol.* **19**, 905-911 (1989).
34. Roux,E., Helg,C., Chapuis,B., Jeannet,M. & Roosnek,E. T-cell repertoire complexity after allogeneic bone marrow transplantation. *Hum. Immunol.* **48**, 135-138 (1996).
35. Poussier,P., Teh,H.S. & Julius,M. Thymus-independent positive and negative selection of T cells expressing a major histocompatibility complex class I restricted transgenic T cell receptor alpha/beta in the intestinal epithelium. *J. Exp. Med.* **178**, 1947-1957 (1993).
36. Poussier,P., Edouard,P., Lee,C., Binnie,M. & Julius,M. Thymus-independent development and negative selection of T cells expressing T cell receptor alpha/beta in the intestinal epithelium: evidence for distinct circulation patterns of gut- and thymus-derived T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **176**, 187-199 (1992).
37. Dejbakhsh-Jones,S., Okazaki,H. & Strober,S. Similar rates of production of T and B lymphocytes in the bone marrow. *J. Exp. Med.* **181**, 2201-2211 (1995).
38. Dejbakhsh-Jones,S., Jerabek,L., Weissman,I.L. & Strober,S. Extrathymic maturation of alpha beta T cells from hemopoietic stem cells. *J. Immunol.* **155**, 3338-3344 (1995).

39. Maury,S. *et al.* Prolonged immune deficiency following allogeneic stem cell transplantation: risk factors and complications in adult patients. *Br. J. Haematol.* **115**, 630-641 (2001).
40. Ottinger,H.D., Beelen,D.W., Scheulen,B., Schaefer,U.W. & Grosse-Wilde,H. Improved immune reconstitution after allotransplantation of peripheral blood stem cells instead of bone marrow. *Blood* **88**, 2775-2779 (1996).
41. Small,T.N. *et al.* Immune reconstitution following T-cell depleted bone marrow transplantation: effect of age and posttransplant graft rejection prophylaxis. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **3**, 65-75 (1997).
42. Storek,J. & Saxon,A. Reconstitution of B cell immunity following bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **9**, 395-408 (1992).
43. Storek,J., Witherspoon,R.P. & Storb,R. T cell reconstitution after bone marrow transplantation into adult patients does not resemble T cell development in early life. *Bone Marrow Transplant.* **16**, 413-425 (1995).
44. Reusser,P., Riddell,S.R., Meyers,J.D. & Greenberg,P.D. Cytotoxic T-lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation: pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease. *Blood* **78**, 1373-1380 (1991).
45. Lum,L.G., Munn,N.A., Schanfield,M.S. & Storb,R. The detection of specific antibody formation to recall antigens after human bone marrow transplantation. *Blood* **67**, 582-587 (1986).
46. Wang,F.Z. *et al.* Lymphotropic herpesviruses in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* **88**, 3615-3620 (1996).
47. Lucas,K.G., Small,T.N., Heller,G., Dupont,B. & O'Reilly,R.J. The development of cellular immunity to Epstein-Barr virus after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* **87**, 2594-2603 (1996).
48. Douek,D.C. *et al.* Assessment of thymic output in adults after haematopoietic stem-cell transplantation and prediction of T-cell reconstitution. *Lancet* **355**, 1875-1881 (2000).
49. Mackall,C.L., Hakim,F.T. & Gress,R.E. T-cell regeneration: all repertoires are not created equal. *Immunol. Today* **18**, 245-251 (1997).
50. Storek,J. & Storb,R. T-cell reconstitution after stem-cell transplantation--by which organ. *Lancet* **355**, 1843-1844 (2000).
51. Atkinson,K. Reconstruction of the haemopoietic and immune systems after marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **5**, 209-226 (1990).

52. Small,T.N. *et al.* Immune reconstitution following T-cell depleted bone marrow transplantation: effect of age and posttransplant graft rejection prophylaxis. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **3**, 65-75 (1997).
53. Small,T.N. *et al.* Comparison of immune reconstitution after unrelated and related T-cell-depleted bone marrow transplantation: effect of patient age and donor leukocyte infusions. *Blood* **93**, 467-480 (1999).
54. Alpdogan,O. *et al.* Administration of interleukin-7 after allogeneic bone marrow transplantation improves immune reconstitution without aggravating graft-versus-host disease. *Blood* **98**, 2256-2265 (2001).
55. Fry,T.J. *et al.* A potential role for interleukin-7 in T-cell homeostasis. *Blood* **97**, 2983-2990 (2001).
56. Fry,T.J., Christensen,B.L., Komschlies,K.L., Gress,R.E. & Mackall,C.L. Interleukin-7 restores immunity in athymic T-cell-depleted hosts. *Blood* **97**, 1525-1533 (2001).
57. Mackall,C.L. *et al.* IL-7 increases both thymic-dependent and thymic-independent T-cell regeneration after bone marrow transplantation. *Blood* **97**, 1491-1497 (2001).
58. Appelbaum,F.R. Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy. *Nature* **411**, 385-389 (2001).
59. Klein,J. & Sato,A. The HLA system. Second of two parts. *N. Engl. J. Med.* **343**, 782-786 (2000).
60. Klein,J. & Sato,A. The HLA system. First of two parts. *N. Engl. J. Med.* **343**, 702-709 (2000).
61. Petersdorf,E. *et al.* Genomics of unrelated-donor hematopoietic cell transplantation. *Curr. Opin. Immunol.* **13**, 582-589 (2001).
62. Parham,P. Immunology. Deconstructing the MHC. *Nature* **360**, 300-301 (1992).
63. Poinar,H.N. *et al.* Molecular coproscopy: dung and diet of the extinct ground sloth *Nothotheriops shastensis*. *Science* **281**, 402-406 (1998).
64. Zinkernagel,R.M. & Doherty,P.C. MHC-restricted cytotoxic T cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction-specificity, function, and responsiveness. *Adv. Immunol.* **27**, 51-177 (1979).
65. Barnes,D.W.H., Corp,M.J., Loutit,J.F. & and Neal,F.E. Treatment of murine leukaemia with x-rays and homologous bone marrow. *Br.Med.J* **2**, 626-627. 1956.

66. Billingham RE, B.L.M.P. Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature*, 603-606. 1953.
67. Nash, R.A. *et al.* Acute graft-versus-host disease: analysis of risk factors after allogeneic marrow transplantation and prophylaxis with cyclosporine and methotrexate. *Blood* **80**, 1838-1845 (1992).
68. Nash, R.A. *et al.* Phase 3 study comparing methotrexate and tacrolimus with methotrexate and cyclosporine for prophylaxis of acute graft-versus-host disease after marrow transplantation from unrelated donors. *Blood* **96**, 2062-2068 (2000).
69. Martin, P.J. *et al.* A retrospective analysis of therapy for acute graft-versus-host disease: initial treatment. *Blood* **76**, 1464-1472 (1990).
70. Ratanatharathorn, V. *et al.* Phase III study comparing methotrexate and tacrolimus (prograf, FK506) with methotrexate and cyclosporine for graft-versus-host disease prophylaxis after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. *Blood* **92**, 2303-2314 (1998).
71. Sullivan, K.M. *et al.* Chronic graft-versus-host disease in 52 patients: adverse natural course and successful treatment with combination immunosuppression. *Blood* **57**, 267-276 (1981).
72. Champlin, R.E. *et al.* Blood stem cells compared with bone marrow as a source of hematopoietic cells for allogeneic transplantation. IBMTR Histocompatibility and Stem Cell Sources Working Committee and the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Blood* **95**, 3702-3709 (2000).
73. Atkinson, K. Chronic graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant.* **5**, 69-82 (1990).
74. Goker, H., Haznedaroglu, I.C. & Chao, N.J. Acute graft-vs-host disease: pathobiology and management. *Exp. Hematol.* **29**, 259-277 (2001).
75. Xun, C.Q., Thompson, J.S., Jennings, C.D., Brown, S.A. & Widmer, M.B. Effect of total body irradiation, busulfan-cyclophosphamide, or cyclophosphamide conditioning on inflammatory cytokine release and development of acute and chronic graft-versus-host disease in H-2-incompatible transplanted SCID mice. *Blood* **83**, 2360-2367 (1994).
76. Kupper, T.S. Immune and inflammatory processes in cutaneous tissues. Mechanisms and speculations. *J. Clin. Invest* **86**, 1783-1789 (1990).
77. Norton, J. & Sloane, J.P. ICAM-1 expression on epidermal keratinocytes in cutaneous graft-versus-host disease. *Transplantation* **51**, 1203-1206 (1991).

78. Thornhill,M.H. *et al.* Tumor necrosis factor combines with IL-4 or IFN-gamma to selectively enhance endothelial cell adhesiveness for T cells. The contribution of vascular cell adhesion molecule-1-dependent and -independent binding mechanisms. *J. Immunol.* **146**, 592-598 (1991).
79. Guinan,E.C. *et al.* Transplantation of anergic histoincompatible bone marrow allografts. *N. Engl. J. Med.* **340**, 1704-1714 (1999).
80. Filep,J.G., Baron,C., Lachance,S., Perreault,C. & Chan,J.S. Involvement of nitric oxide in target-cell lysis and DNA fragmentation induced by murine natural killer cells. *Blood* **87**, 5136-5143 (1996).
81. Fukushi,N. *et al.* Thymus: a direct target tissue in graft-versus-host reaction after allogeneic bone marrow transplantation that results in abrogation of induction of self-tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **87**, 6301-6305 (1990).
82. Lapp,W.S., Ghayur,T., Mendes,M., Seddik,M. & Seemayer,T.A. The functional and histological basis for graft-versus-host-induced immunosuppression. *Immunol. Rev.* **88**, 107-133 (1985).
83. Seddik,M., Seemayer,T.A. & Lapp,W.S. T cell functional defect associated with thymid epithelial cell injury induced by a graft-versus-host reaction. *Transplantation* **29**, 61-66 (1980).
84. Desbarats,J. & Lapp,W.S. Thymic selection and thymic major histocompatibility complex class II expression are abnormal in mice undergoing graft-versus-host reactions. *J. Exp. Med.* **178**, 805-814 (1993).
85. Hollander,G.A., Widmer,B. & Burakoff,S.J. Loss of normal thymic repertoire selection and persistence of autoreactive T cells in graft vs host disease. *J. Immunol.* **152**, 1609-1617 (1994).
86. Mackall,C.L. & Gress,R.E. Pathways of T-cell regeneration in mice and humans: implications for bone marrow transplantation and immunotherapy. *Immunol. Rev.* **157**, 61-72 (1997).
87. Weiden,P.L. *et al.* Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. *N. Engl. J. Med.* **300**, 1068-1073 (1979).
88. Pichert,G. *et al.* Distinct patterns of minimal residual disease associated with graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. *J. Clin. Oncol.* **13**, 1704-1713 (1995).
89. Donohue,J., Homge,M. & Kernan,N.A. Characterization of cells emerging at the time of graft failure after bone marrow transplantation from an unrelated marrow donor. *Blood* **82**, 1023-1029 (1993).

90. Mehta,J. *et al.* Bone marrow transplantation for primary refractory acute leukaemia. *Bone Marrow Transplant.* **14**, 415-418 (1994).
91. Green,A. *et al.* Children with acute lymphoblastic leukemia who receive T-cell-depleted HLA mismatched marrow allografts from unrelated donors have an increased incidence of primary graft failure but a similar overall transplant outcome. *Blood* **94**, 2236-2246 (1999).
92. Marmont,A.M. *et al.* T-cell depletion of HLA-identical transplants in leukemia. *Blood* **78**, 2120-2130 (1991).
93. Ho,V.T. & Soiffer,R.J. The history and future of T-cell depletion as graft-versus-host disease prophylaxis for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* **98**, 3192-3204 (2001).
94. Champlin,R. *et al.* Selective depletion of CD8+ T lymphocytes for prevention of graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* **76**, 418-423 (1990).
95. Soiffer,R.J. *et al.* CD6-depleted allogeneic bone marrow transplantation for acute leukemia in first complete remission. *Blood* **89**, 3039-3047 (1997).
96. Soiffer,R.J. *et al.* CD6+ donor marrow T-cell depletion as the sole form of graft-versus-host disease prophylaxis in patients undergoing allogeneic bone marrow transplant from unrelated donors. *J. Clin. Oncol.* **19**, 1152-1159 (2001).
97. Herve,P. *et al.* Removal of marrow T cells with OKT3-OKT11 monoclonal antibodies and complement to prevent acute graft-versus-host disease. A pilot study in ten patients. *Transplantation* **39**, 138-143 (1985).
98. Prentice,H.G. *et al.* Depletion of T lymphocytes in donor marrow prevents significant graft-versus-host disease in matched allogeneic leukaemic marrow transplant recipients. *Lancet* **1**, 472-476 (1984).
99. Papadopoulos,E.B. *et al.* T-cell-depleted allogeneic bone marrow transplantation as postremission therapy for acute myelogenous leukemia: freedom from relapse in the absence of graft-versus-host disease. *Blood* **91**, 1083-1090 (1998).
100. Papadopoulos,E.B. *et al.* T-cell-depleted allogeneic bone marrow transplantation as postremission therapy for acute myelogenous leukemia: freedom from relapse in the absence of graft-versus-host disease. *Blood* **91**, 1083-1090 (1998).
101. Soiffer,R.J. *et al.* Reconstitution of T-cell function after CD6-depleted allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* **75**, 2076-2084 (1990).
102. Roux,E., Helg,C., Chapuis,B., Jeannet,M. & Roosnek,E. T-cell repertoire complexity after allogeneic bone marrow transplantation. *Hum. Immunol.* **48**, 135-138 (1996).

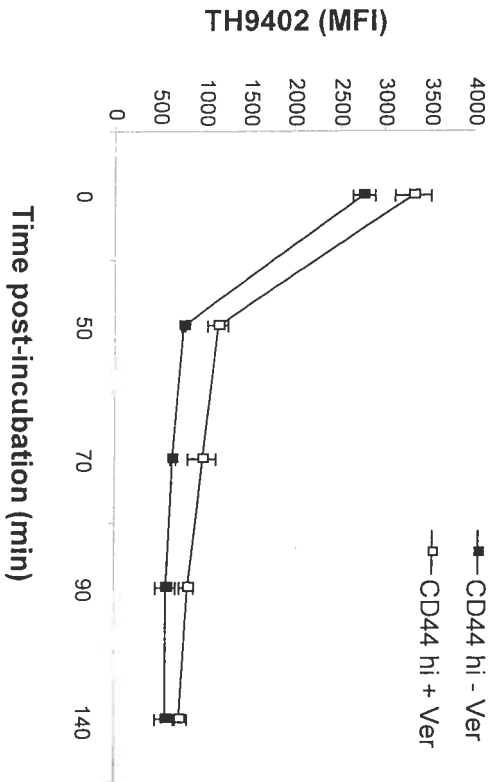
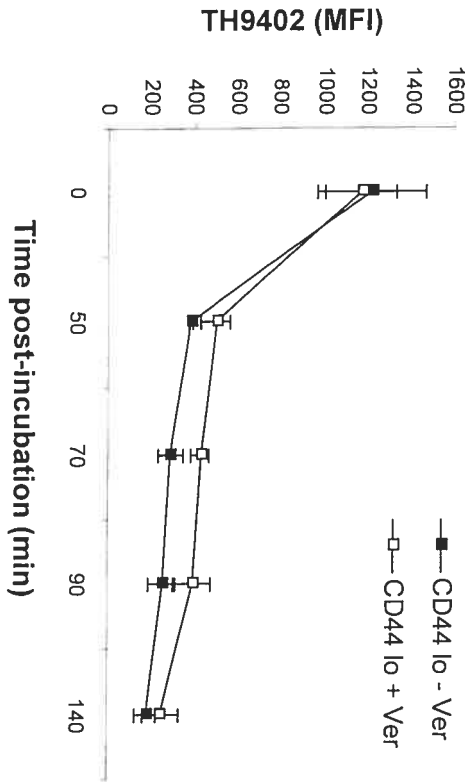
103. Shlomchik,W.D. *et al.* Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science* **285**, 412-415 (1999).
104. Ruggeri,L. *et al.* Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* **295**, 2097-2100 (2002).
105. Cohen,J.L., Trenado,A., Vasey,D., Klatzmann,D. & Salomon,B.L. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T Cells: new therapeutics for graft-versus-host disease. *J. Exp. Med.* **196**, 401-406 (2002).
106. Tiberghien,P. *et al.* Administration of herpes simplex-thymidine kinase-expressing donor T cells with a T-cell-depleted allogeneic marrow graft. *Blood* **97**, 63-72 (2001).
107. Levy,J.G. Photosensitizers in photodynamic therapy. *Semin. Oncol.* **21**, 4-10 (1994).
108. Henderson,B.W. & Dougherty,T.J. How does photodynamic therapy work? *Photochem. Photobiol.* **55**, 145-157 (1992).
109. Pass,H.I. Photodynamic therapy in oncology: mechanisms and clinical use. *J. Natl. Cancer Inst.* **85**, 443-456 (1993).
110. Mulroney,C.M., Gluck,S. & Ho,A.D. The use of photodynamic therapy in bone marrow purging. *Semin. Oncol.* **21**, 24-27 (1994).
111. Villeneuve,L. Ex vivo photodynamic purging in chronic myelogenous leukaemia and other neoplasias with rhodamine derivatives. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **30** (Pt 1), 1-17 (1999).
112. Guimond,M. *et al.* P-glycoprotein targeting: a unique strategy to selectively eliminate immunoreactive T cells. *Blood* **100**, 375-382 (2002).
113. Guimond,M. *et al.* P-glycoprotein targeting: a unique strategy to selectively eliminate immunoreactive T cells. *Blood* **100**, 375-382 (2002).
114. Chaudhary,P.M., Mechetner,E.B. & Roninson,I.B. Expression and activity of the multidrug resistance P-glycoprotein in human peripheral blood lymphocytes. *Blood* **80**, 2735-2739 (1992).
115. Ludescher,C., Pall,G., Irschick,E.U. & Gastl,G. Differential activity of P-glycoprotein in normal blood lymphocyte subsets. *Br. J. Haematol.* **101**, 722-727 (1998).
116. Pilarski,L.M., Paine,D., McElhaney,J.E., Cass,C.E. & Belch,A.R. Multidrug transporter P-glycoprotein 170 as a differentiation antigen on normal human lymphocytes and thymocytes: modulation with differentiation stage and during aging. *Am. J. Hematol.* **49**, 323-335 (1995).

117. Chen,B.J., Cui,X., Liu,C. & Chao,N.J. Prevention of graft-versus-host disease while preserving graft-versus-leukemia effect after selective depletion of host-reactive T cells by photodynamic cell purging process. *Blood* **99**, 3083-3088 (2002).
118. Levy,J.G. Photosensitizers in photodynamic therapy. *Semin. Oncol.* **21**, 4-10 (1994).
119. Richter,A.M. *et al.* Activation of benzoporphyrin derivative in the circulation of mice without skin photosensitivity. *Photochem. Photobiol.* **59**, 350-355 (1994).
120. Levy,J.G. Photosensitizers in photodynamic therapy. *Semin. Oncol.* **21**, 4-10 (1994).
121. Richter,A.M. *et al.* Activation of benzoporphyrin derivative in the circulation of mice without skin photosensitivity. *Photochem. Photobiol.* **59**, 350-355 (1994).
122. Bommhardt,U., Cerottini,J.C. & MacDonald,H.R. Heterogeneity in P-glycoprotein (multidrug resistance) activity among murine peripheral T cells: correlation with surface phenotype and effector function. *Eur. J. Immunol.* **24**, 2974-2981 (1994).
123. MacDonald,H.R., Bommhardt,U. & Cerottini,J.C. Developmentally regulated expression of P-glycoprotein (multidrug resistance) activity in mouse thymocytes. *Eur. J. Immunol.* **25**, 1457-1460 (1995).
124. Ferlini,C., Biselli,R., Nisini,R. & Fattorossi,A. Rhodamine 123: a useful probe for monitoring T cell activation. *Cytometry* **21**, 284-293 (1995).
125. Leprat,P., Ratinaud,M.H., Maftah,A., Petit,J.M. & Julien,R. Use of nonyl acridine orange and rhodamine 123 to follow biosynthesis and functional assembly of mitochondrial membrane during L1210 cell cycle. *Exp. Cell Res.* **186**, 130-137 (1990).
126. Davis,S., Weiss,M.J., Wong,J.R., Lampidis,T.J. & Chen,L.B. Mitochondrial and plasma membrane potentials cause unusual accumulation and retention of rhodamine 123 by human breast adenocarcinoma-derived MCF-7 cells. *J. Biol. Chem.* **260**, 13844-13850 (1985).
127. Lowenberg,B. *et al.* Graft-versus-host disease following transplantation of 'one log' versus 'two log' T-lymphocyte-depleted bone marrow from HLA-identical donors. *Bone Marrow Transplant.* **1**, 133-140 (1986).
128. Rocha,B., Dautigny,N. & Pereira,P. Peripheral T lymphocytes: expansion potential and homeostatic regulation of pool sizes and CD4/CD8 ratios in vivo. *Eur. J. Immunol.* **19**, 905-911 (1989).

129. Ku,C.C., Murakami,M., Sakamoto,A., Kappler,J. & Marrack,P. Control of homeostasis of CD8+ memory T cells by opposing cytokines. *Science* **288**, 675-678 (2000).
130. Antin,J.H. & Ferrara,J.L. Cytokine dysregulation and acute graft-versus-host disease. *Blood* **80**, 2964-2968 (1992).
131. Tschetter,J.R., Mozes,E. & Shearer,G.M. Progression from acute to chronic disease in a murine parent-into-F1 model of graft-versus-host disease. *J. Immunol.* **165**, 5987-5994 (2000).
132. Fadok,V.A. *et al.* Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J. Clin. Invest* **101**, 890-898 (1998).
133. Voll,R.E. *et al.* Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* **390**, 350-351 (1997).
134. Cohen,J.L., Boyer,O. & Klatzmann,D. Suicide gene therapy of graft-versus-host disease: immune reconstitution with transplanted mature T cells. *Blood* **98**, 2071-2076 (2001).
135. Mevorach,D., Zhou,J.L., Song,X. & Elkon,K.B. Systemic exposure to irradiated apoptotic cells induces autoantibody production. *J. Exp. Med.* **188**, 387-392 (1998).
136. Cho,B.K., Rao,V.P., Ge,Q., Eisen,H.N. & Chen,J. Homeostasis-stimulated proliferation drives naive T cells to differentiate directly into memory T cells. *J. Exp. Med.* **192**, 549-556 (2000).
137. Goldrath,A.W., Bogatzki,L.Y. & Bevan,M.J. Naive T cells transiently acquire a memory-like phenotype during homeostasis-driven proliferation. *J. Exp. Med.* **192**, 557-564 (2000).

ANNEXES

A. CD4



B. CD8

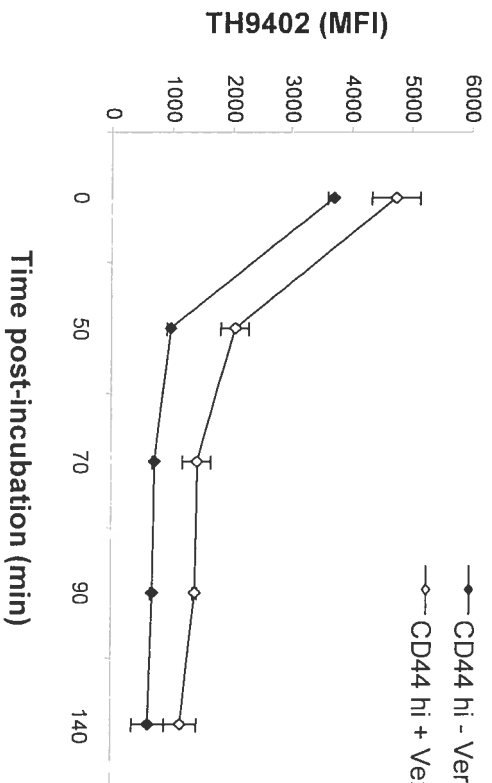
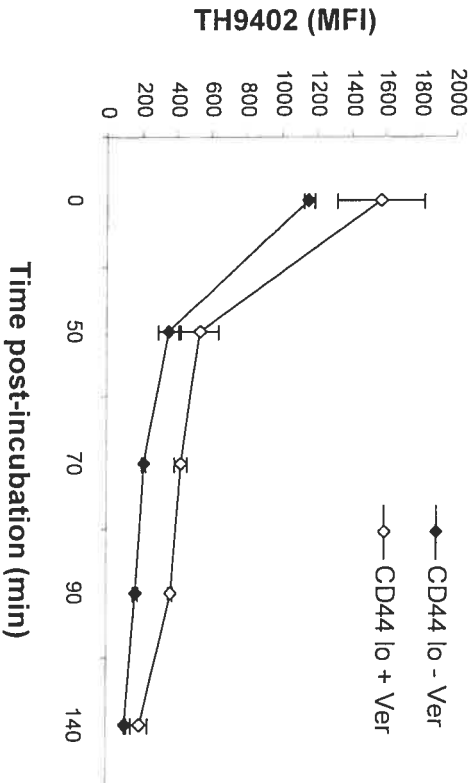


Figure annexe

Radia Sidi Boumédine

**Département de Science Biomédicale
Faculté de médecine**

M.Sc. Maîtrise Science biomédicale

Article :

SPECIFIC ELIMINATION OF ALLOREACTIVE T LYMPHOCYTES BY TH9402 BASED PHOTODYNAMIC CELL THERAPY. Radia Sidi Boumédine, Gorazd Krosl, Claude Perreault, and Denis Claude Roy. Article en préparation. La revue : Journal of Immunology.

Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que **Radia Sidi Boumédine** inclue cet article dans son mémoire de Maîtrise qui a pour titre **Prévention de la maladie du greffon contre l'hôte par thérapie photodynamique.**

Coauteur Signature Date (Gorazd Krosl)

[Signature] 29. Feb. 2003

Coauteur Signature Date (Claude Perreault)

[Signature] 29 Avril 2003

Coauteur Signature Date (Denis Claude Roy)

[Signature] 29 avril 2003